



**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA DE QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE BORO,  
FLUORUROS Y NITRITOS EN AGUA MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE LUZ  
VISIBLE**

**Autora: Yadira Maribel Solís Cúñez**

yadymasol@gmail.com

**Tesis para optar por el Título Profesional de QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**Tutora: Dra. Teresa de Jesús Gordón Aldas**

teresadesanchez@yahoo.com

**Quito, enero del 2013**

Solís Cúñez, Yadira Maribel (2013). Validación de métodos analíticos para la determinación de boro, fluoruros y nitritos en agua mediante espectrofotometría de luz visible. Trabajo de investigación para optar por el grado de Química de Alimentos. Quito: UCE. 105 p.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo es dedicado a mis padres quienes con el ejemplo, amor y comprensión supieron guiarme por el buen camino dándome el soporte fundamental en el transcurso de mi carrera y de todos mis estudios, durante y después de la elaboración del presente trabajo e impulsándome cada día para culminar con esta meta y etapa de mi vida.

A mi esposo quien con una palabra, con un consejo, me brindó su ayuda incondicional en los momentos más difíciles para no desmayar y continuar con este sueño.

## **AGRADECIMIENTO**

El presente trabajo va dirigido con una expresión de gratitud al laboratorio ambiental de Oferta de Servicios y Productos OSP que me apoyó para el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Teresa de Jesús Gordón Aldás quien en el transcurso de esta última etapa universitaria me dio las pautas para llegar a la conclusión de la misma.

A todas las personas que siempre han estado pendientes del avance y necesidades de este trabajo.

A mí querida Universidad Central del Ecuador y muy especialmente a la Facultad de Ciencias Químicas, porque en sus aulas me permitió compartir experiencias y proyectos, proporcionándome el horizonte que será mi futuro profesional.

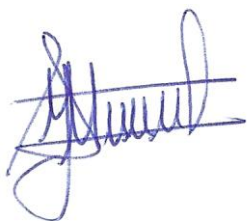
**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA DE QUÍMICA DE ALIMENTOS**

Yo, **Yadira Maribel Solís Cúñez**, con CC: **172251169-6**, en calidad de autora del trabajo de investigación o tesis realizada sobre **“Validación de métodos analíticos para la determinación de boro, fluoruros y nitritos en agua mediante espectrofotometría de luz visible”**, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o de parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor; de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Quito, a los 10 días del mes de diciembre del 2012



Yadira Maribel Solís Cúñez

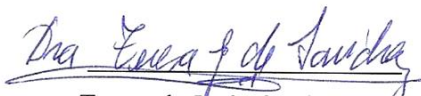
CC: 172251169-6

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**CARRERA DE QUÍMICA DE ALIMENTOS**

Por la presente, deixo constancia que he leído la Tesis presentada por la señorita **Yadira Maribel Solís Cúñez**, para optar por el título profesional de **Químico de Alimentos**, cuyo tema es: **Validación de métodos analíticos para la determinación de boro, fluoruros y nitritos en agua mediante espectrofotometría de luz visible**, la misma que reúne los requerimientos y los méritos suficientes para ser sometido a evaluación por el Tribunal Calificador.

En la ciudad de Quito, a los 10 días del mes de diciembre del 2012

  
Teresa de Jesús Gordón Aldás  
CC: 1800147876



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



INFORME DEL TRIBUNAL CALIFICADOR DE LA TESIS

Quito, 10 de DICIEMBRE del 2012

Señor

Dr. Wilson Parra

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Presente

Señor Decano:


El Tribunal encargado de calificar la Tesis: **Validación de métodos analíticos para la determinación de boro, fluoruros y nitritos en agua mediante espectrofotometría de luz visible**, presentada por: **Yadira Maribel Solís Cúñez**, estudiante de la Carrera de: **Química de Alimentos**, luego del estudio y revisión correspondiente, resolvió:

APROBAR ☒ la Tesis con la NOTA de: 20 (veinte)

REPROBAR ☐ la Tesis.

Es cuanto podemos informar.

Atentamente,

  
FIRMA  
Dr. Wilson Parra  
CC: 1801099902

  
FIRMA  
Dr. Iván Tapia  
CC: 170846835-8

  
FIRMA  
Dra. Teresa Gordon  
CC: 1800147876

**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**CARRERA DE QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio Ambiental de Oferta de Servicios y Productos (OSP) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, ubicado en las calles Francisco Viteri s/n y Gilberto Gato, sector centro norte del Distrito Metropolitano de Quito.



## CONTENIDOS

	pág.
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	2
1.2.1 Hipótesis del Trabajo .....	2
1.3 OBJETIVO GENERAL .....	2
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	2
1.5 IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	3
 CAPÍTULO II .....	 4
2. MARCO TEÓRICO .....	4
2.1 ANTECEDENTES .....	4
2.2 FUNDAMENTO TEÓRICO .....	4
2.2.1 Parámetros de calidad .....	4
2.2.1.1 <i>Aseguramiento de la calidad</i> .....	4
2.2.1.2 <i>Control de calidad.</i> .....	5
2.2.2 Validación de métodos.....	5
2.2.2.1 <i>Proceso de validación.</i> .....	6
2.2.2.2. <i>Parámetros de la validación.</i> .....	9
Identificación, Selectividad y Especificidad. ....	9
Límite de detección (LD) .....	10
Límite de cuantificación (LC). ....	10
Intervalo de trabajo e Intervalo lineal. ....	11
Sensibilidad. ....	14
Exactitud. ....	15
Robustez.....	20
Aplicabilidad.....	20
2.2.2.3 <i>Incertidumbre.</i> .....	21
2.2.3 El Agua .....	23
2.2.3.1 <i>Estructura del agua.</i> .....	23
2.2.3.2 <i>Propiedades del agua.</i> .....	24
2.2.3.3 <i>El Agua en la Tierra.</i> .....	25

	pág.
2.2.3.4 <i>Agua Potable.</i> .....	26
2.2.4 <i>Analitos</i> .....	26
2.2.4.1 <i>Boro</i> .....	26
2.2.4.2 <i>Fluoruro</i> .....	27
2.2.4.3 <i>Nitritos</i> .....	27
2.2.5 <i>Espectrofotometría</i> .....	28
2.2.5.1 <i>Radiación Electromagnética.</i> .....	28
2.2.5.2 <i>Espectroscopia de absorción.</i> .....	29
2.2.5.3 <i>Espectrofotómetro.</i> .....	29
2.3 <i>FUNDAMENTO LEGAL</i> .....	31
 CAPÍTULO III .....	 32
3. <i>METODOLOGÍA</i> .....	32
3.1. <i>TIPO DE INVESTIGACIÓN</i> .....	32
3.2 <i>POBLACIÓN Y MUESTRA</i> .....	32
3.3 <i>DISEÑO EXPERIMENTAL</i> .....	32
3.3.1 <i>Diseño de la validación</i> .....	33
3.3.1.1 <i>Parámetros de validación.</i> .....	36
3.4 <i>MATERIALES Y MÉTODOS</i> .....	39
3.4.1 <i>Método espectrofotométrico para la determinación de boro</i> .....	40
3.4.2 <i>Método espectrofotométrico para la determinación de fluoruros</i> .....	43
3.4.3 <i>Método espectrofotométrico para la determinación de nitritos</i> .....	45
 CAPÍTULO IV .....	 49
4. <i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> .....	49
4.1 <i>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</i> .....	49
4.1.1 <i>Análisis de resultados del Boro</i> .....	49
4.1.1.1 <i>Límites para la determinación de boro.</i> .....	49
4.1.1.2 <i>Linealidad para la determinación de boro.</i> .....	50
4.1.1.3 <i>Exactitud para la determinación de boro.</i> .....	55
4.1.1.4 <i>Incertidumbre para la determinación de boro.</i> .....	59
<i>Función respuesta</i> .....	59
<i>Evaluación de la Incertidumbre en diferentes rangos.</i> .....	64
4.1.2 <i>Análisis de resultados de Fluoruros</i> .....	67
4.1.2.1 <i>Límites para la determinación de fluoruros.</i> .....	67

	<b>pág.</b>
4.1.2.2 <i>Exactitud para la determinación de fluoruros</i> .....	68
4.1.2.3 <i>Incertidumbre del método para la determinación de fluoruros</i> . ....	72
Evaluación de la Incertidumbre.....	72
4.1.3 Análisis de resultados de Nitritos .....	74
4.1.3.1 <i>Límites para la determinación de nitritos</i> . ....	74
4.1.3.2 <i>Linealidad para la determinación de nitritos</i> . ....	75
4.1.3.3 <i>Exactitud para la determinación de nitritos</i> . ....	80
4.1.3.4 <i>Incertidumbre del método para la determinación de nitritos</i> . ....	84
Función respuesta.....	84
Evaluación de la Incertidumbre según el rango. ....	89
 CAPÍTULO V .....	 93
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	93
5.1 CONCLUSIONES .....	93
5.1.1 Conclusiones de la determinación de Boro.....	93
5.1.2 Conclusiones de la determinación de Fluoruros .....	94
5.1.3 Conclusiones de la determinación de Nitritos .....	95
5.2 RECOMENDACIONES.....	96
 Bibliografía .....	 98

## LISTA DE GRÁFICOS

	pág.
Gráfica 4-1. Curva de calibración de boro día 1 .....	50
Gráfica 4-2. Curva de calibración de boro día 2 .....	51
Gráfica 4-3. Curva de calibración de boro día 3 .....	52
Gráfica 4-4. Curva de calibración de boro día 4 .....	53
Gráfica 4-5. Curva de calibración de boro día 5 .....	54
Gráfica 4-6. Curva de calibración de nitritos día 1 .....	75
Gráfica 4-7. Curva de calibración de nitritos día 2 .....	76
Gráfica 4-8. Curva de calibración de nitritos día 3 .....	77
Gráfica 4-9. Curva de calibración de nitritos día 4 .....	78
Gráfica 4-10. Curva de calibración de nitritos día 5 .....	79

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 2-1.Ciclo de validación .....	6
Figura 2-2. Diagrama de desarrollo de una validación .....	8
Figura 2-3. Comportamiento lineal, Curva de calibración .....	12
Figura 2-4. Jerarquía de los niveles de precisión .....	17
Figura 2-5. Estructura molecular del agua .....	23
Figura 2-6. Grado de ionización del agua .....	25
Figura 2-7. Componentes de instrumentos de espectroscopia óptica .....	29
Figura 3-1 Proceso de validación de boro .....	34
Figura 3-2 Proceso de validación de fluoruros.....	35
Figura 3-3 Proceso de validación de nitritos .....	36
Figura 3-4 Reacción del ácido carmínico en ácido sulfúrico en presencia de boro (Soto, 2000) ....	40
Figura 3-5 Reacción de la determinación de nitrito por el colorante azo púrpura .....	45

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 2-1. Identificación de parámetros.....	9
Tabla 2-2. Procedimiento general para evaluar los Límites .....	11
Tabla 2-3. Ecuaciones para el análisis de varianza en una regresión lineal .....	19
Tabla 2-4. Regiones del espectro .....	28
Tabla 3-1 Diseño experimental en condiciones de Repetibilidad .....	38
Tabla 3-2 Diseño experimental en condiciones de Reproducibilidad .....	39
Tabla 3-3 Preparación de estándares de boro .....	43
Tabla 3-4 Preparación de estándares de fluoruros.....	45
Tabla 3-5 Preparación de Estándares de nitritos .....	47
Tabla 4-1. Análisis del LD y LC de boro .....	49
Tabla 4-2. Datos experimentales de Absorbancias de boro .....	50
Tabla 4-3. Análisis de la curva de calibración del boro día 1 .....	51
Tabla 4-4. Análisis de la curva de calibración del boro día 2 .....	51
Tabla 4-5. Análisis de la curva de calibración del boro día 3 .....	52
Tabla 4-6. Análisis de la curva de calibración del boro día 4 .....	53
Tabla 4-7. Análisis de la curva de calibración del boro día 5 .....	54
Tabla 4-8. Análisis global de las curvas de calibración de boro .....	55
Tabla 4-9. Análisis de repetibilidad de boro .....	56
Tabla 4-10. Análisis de varianza de boro para repetibilidad .....	56
Tabla 4-11. Análisis de reproducibilidad de boro .....	57
Tabla 4-12. Análisis de varianza de boro para reproducibilidad.....	58
Tabla 4-13. Análisis de desviación del laboratorio en la determinación de boro.....	59
Tabla 4-14. Resolución del espectrofotómetro HACH DR2800.....	59
Tabla 4-15. Cálculo de la incertidumbre de las lecturas de los estándares de boro .....	60
Tabla 4-16. Incertidumbre de la solución madre de boro ( $\mu$ solución madre) .....	61
Tabla 4-17. Cálculo de la incertidumbre en la preparación de estándares para cada nivel de concentración de boro ( $\mu$ patrón) .....	62
Tabla 4-18. Resumen del cálculo de la incertidumbre de los estándares de boro (% $\mu$ nivel).....	62
Tabla 4-19. Incertidumbre expandida para boro (%UFR) .....	63
Tabla 4-20. Incertidumbre de los equipos utilizados en la medición de boro .....	64
Tabla 4-21. Incertidumbre de reproducibilidad y exactitud del rango bajo de boro .....	64
Tabla 4-22. Incertidumbre ( $\mu$ ) de rango bajo de boro .....	64
Tabla 4-23. Incertidumbre de reproducibilidad y exactitud del rango alto de boro .....	65

Tabla 4-24. Incertidumbre ( $\mu$ ) de rango alto de boro .....	65
Tabla 4-25. Resumen de resultados del boro y criterios de aceptación.....	66
Tabla 4-26. Análisis del LD y LC de fluoruros.....	67
Tabla 4-27. Análisis de repetibilidad de fluoruros .....	68
Tabla 4-28. Análisis de varianza de fluoruros para repetibilidad.....	69
Tabla 4-29. Análisis de reproducibilidad de fluoruros.....	70
Tabla 4-30. Análisis de varianza de fluoruros para reproducibilidad .....	70
Tabla 4-31. Análisis de desviación del laboratorio en la determinación de fluoruros .....	71
Tabla 4-32. Incertidumbre de los equipos utilizados en la medición de fluoruros.....	72
Tabla 4-33. Incertidumbre de reproducibilidad y exactitud de fluoruros.....	72
Tabla 4-34. Incertidumbre ( $\mu$ ) de fluoruros .....	72
Tabla 4-35. Resumen de resultados de fluoruros y criterios de aceptación .....	73
Tabla 4-36. Análisis del LD y LC de nitritos .....	74
Tabla 4-37. Determinación de absorbancias de nitritos en diferentes días .....	75
Tabla 4-38. Análisis de la curva de calibración de nitritos día 1 .....	76
Tabla 4-39. Análisis de la curva de calibración de nitritos día 2 .....	76
Tabla 4-40. Análisis de la curva de calibración de nitritos día 3 .....	77
Tabla 4-41. Análisis de la curva de calibración de nitritos día 4 .....	78
Tabla 4-42. Análisis de la curva de calibración de nitritos día 5 .....	79
Tabla 4-43. Análisis global de las curvas de calibración de nitritos .....	80
Tabla 4-44. Análisis de repetibilidad de nitritos .....	81
Tabla 4-45. Análisis de varianza de nitritos para repetibilidad.....	81
Tabla 4-46. Análisis de reproducibilidad de nitritos .....	82
Tabla 4-47. Análisis de varianza de nitritos para reproducibilidad.....	83
Tabla 4-48. Análisis de desviación del laboratorio en la determinación de nitritos.....	84
Tabla 4-49. Resolución del espectrofotómetro HACH DR 2800.....	84
Tabla 4-50. Lectura de absorbancias para cada concentración de nitritos .....	85
Tabla 4-51. Incertidumbre de la solución madre de nitritos ( $\mu$ solución madre) .....	86
Tabla 4-52. Cálculo de la incertidumbre en la preparación de estándares para cada nivel de concentración de nitritos ( $\mu$ patrón) .....	87
Tabla 4-53. Resumen del cálculo de la incertidumbre de los estándares de nitritos (% $\mu$ nivel) .....	87
Tabla 4-54. Incertidumbre Expandida para nitritos (%UFR).....	88
Tabla 4-55. Incertidumbre de los equipos utilizados en la medición de nitritos .....	89
Tabla 4-56. Incertidumbre de reproducibilidad y exactitud del rango bajo de nitritos .....	89
Tabla 4-57. Incertidumbre ( $\mu$ ) de rango bajo de nitritos .....	89

	<b>pág.</b>
Tabla 4-58. Incertidumbre de reproducibilidad y exactitud del rango medio de nitritos .....	90
Tabla 4-59. Incertidumbre ( $\mu$ ) de rango medio de nitritos .....	90
Tabla 4-60. Incertidumbre de reproducibilidad y exactitud del rango alto de nitritos .....	91
Tabla 4-61. Incertidumbre ( $\mu$ ) de rango alto de nitritos .....	91
Tabla 4-62. Resumen de resultados de nitritos y criterios de aceptación.....	92



## LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A.....	101
ANEXO B.....	102
ANEXO C.....	103
ANEXO D.....	104
ANEXO E.....	105

## **RESUMEN DOCUMENTAL**

En el presente trabajo se describe el proceso de validación de los métodos analíticos para la determinación de boro y nitritos en el espectrofotómetro HACH DR 2800 y fluoruros en el fotómetro MERCK SQ118, mediante espectrofotometría de luz visible desarrollados en el laboratorio ambiental de Oferta de Servicios y Productos (OSP) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador que cuenta con tecnología, equipos, materiales y reactivos, necesarios para llevar a cabo los análisis rutinario en aguas.

Los métodos cumplen con los parámetros de validación requeridos por el laboratorio OSP que son: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango de trabajo, precisión, exactitud, recuperación e incertidumbre.

Mediante la evaluación estadística de los resultados experimentales y junto a los criterios de aceptación se evaluó los parámetros de validación antes citados y se concluye el registro de la evidencia objetiva que demuestra que los métodos validados cumplen con los requisitos exigidos por la Norma ISO/IEC 17025.2006 y la Norma NTE INEN 1108: 2010 Requisitos Agua Potable asegurando de esta manera resultados confiables para su aplicación analítica en el laboratorio y aumentar el grado de acreditación emitido por el OAE

### **Palabras claves**

VALIDACIÓN DE MÉTODOS,  
PARÁMETROS DE VALIDACIÓN,  
ESPECTROFOTOMETRÍA DE LUZ VISIBLE,  
BORO,  
FLUORUROS,  
NITRITOS,  
LABORATORIO AMBIENTAL DE OFERTA DE SERVICIOS Y PRODUCTOS (OSP),  
NORMA ISO/IEC 17025.2006,  
NORMA NTE INEN 1108: 2010.

## **ABSTRACT**

This paper describes the validation of analytical methods for the determination of boron and nitrite in HACH DR 2800 spectrophotometer and fluorides in MERCK SQ118 photometer by visible light spectrophotometry developed in the environmental laboratory of Oferta de Servicios y Productos (OSP) of the Faculty of Chemistry of the Universidad Central del Ecuador that has technology, equipment, materials and reagents necessary to perform routine water analyzes.

The methods meet with validation parameters required by the laboratory OSP: limit of detection, limit of quantification, linearity, working range, precision, accuracy, recovery and uncertainty.

By statistical evaluation of experimental results and with the acceptance criteria evaluated validation parameters aforementioned and concludes recording the objective evidence demonstrating that the validated methods meet with the requirements of the norm ISO/IEC 17025.2006 and the norm NTE INEN 1108: 2010 Water Requirements ensuring reliable results for use in the laboratory and increase the degree of accreditation issued by the OAE.

## **KEYWORDS**

VALIDATION OF METHODS

VALIDATION PARAMETERS,

VISIBLE LIGHT SPECTROPHOTOMETER,

BORON,

FLUORIDE,

NITRITE,

LABORATORY ENVIRONMENTAL OF OFERTAS DE SERVICIOS Y PRODUCTOS (OSP),

NORM ISO/IEC 17025.2006,

NORM NTE INEN 1108: 2010.

## ABREVIATURAS

<b>Abs.</b>	= Absorbancia
<b>ANOVA</b>	= Análisis de varianza
<b>APHA</b>	= Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater
<b>CV%</b>	= Porcentaje de coeficiente de variación
<b>F</b>	= Fisher
<b>FD</b>	= Factor de dilución
<b>FDA</b>	= Food and Drug Administration
<b>FR</b>	= Función respuesta
<b>g.l.=v</b>	= Grados de libertad
<b>Ho</b>	= Hipótesis nula
<b>Ha</b>	= Hipótesis alterna
<b>IR</b>	= Infrarrojo
<b>k</b>	= Factor de cobertura
<b>LC</b>	= Límite de Cuantificación
<b>LD</b>	= Límite de detección
<b>LMP</b>	= Límite máximo permitido
<b>Lo</b>	= Ordenada al origen, intercepto
<b>m</b>	= Pendiente
<b>MRC</b>	= Material de Referencia Certificado
<b>OAE</b>	= Organismo de Acreditación Ecuatoriana
<b>OMS</b>	= Organización Mundial de la Salud
<b>OSP</b>	= Laboratorio - Oferta de Servicios y Productos
<b>PTs</b>	= <i>Proficiency Tests</i>
<b>%R</b>	= Porcentaje de recuperabilidad
<b>r<sup>2</sup></b>	= Coeficiente de determinación
<b>S</b>	= Desviación estándar
<b>SR</b>	= Desviación estándar de reproducibilidad
<b>S<sup>2</sup></b>	= Varianza
<b>S<sub>x,y</sub></b>	= Error típico
<b>%u</b>	= Porcentaje de incertidumbre
<b>U</b>	= Incertidumbre expandida
<b>UV</b>	= Ultravioleta

## **CAPÍTULO I**

### **1. INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las investigaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) han servido de base para manejar las normas de agua potable en los diferentes países y continúan siendo la guía para caracterización de las aguas. En los países en vía de desarrollo los tratamientos de potabilización no cubren a toda la población y muchas veces son deficientes por falta de monitoreo de las plantas municipales y de los laboratorios de análisis de este recurso.

El Laboratorio Ambiental de Oferta de Servicios y Productos (OSP) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador presta servicios a la comunidad realizando diferentes análisis fisicoquímicos ambientales proporcionando resultados analíticos de calidad, e innovándolos con procesos eficientes y confiables, basados en normas INEN ISO/IEC17025:2006, contando con la acreditación emitido por el Organismo de Acreditación Ecuatoriano (OAE) quien confirma o reconoce la competencia de los laboratorios.

Debido a que existe la contaminación del agua potable y tomando en cuenta que el boro, fluoruros y nitritos son compuestos que cuando están fuera de los límites aceptados por el INEN 0,5mg/l; 1,5mg/l; 0,2mg/l respectivamente, son causantes de enfermedades, es necesario el análisis de éstos, estableciéndolos como parámetros importantes a medir continuamente cuyo resultado sea seguro, rápido y confiable.

El Laboratorio Ambiental OSP debe generar resultados correctos y ser capaz de demostrar que son correctos proporcionando confianza con los datos obtenidos de los análisis realizados sobre el agua mediante el uso de métodos analíticos previamente validados bajo la norma ISO 17025 para que el cliente pueda tomar decisiones en base a los resultados.

El laboratorio realiza la determinación de boro, fluoruros y nitritos en aguas y es el responsable del proceso de validación. La validación del método para la determinación de boro, fluoruros y nitritos se encuentra dentro de un proceso de mejoramiento de la calidad del Laboratorio Ambiental del OSP, puesto que con esta validación se ampliará el grado de acreditación del laboratorio y hace parte de un ciclo que es renovado con cada modificación que se realiza a los métodos.

El laboratorio valida la aptitud del método y estima la incertidumbre del resultado de un modo que sea ampliamente reconocido, internamente consistente y fácil de interpretar porque es un requisito importante en la práctica de los análisis químicos.

## **1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

El Laboratorio Ambiental de Oferta de Servicios y Productos (OSP) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador no cuenta con un método espectrofotométrico validado para la determinación de boro, fluoruros y nitritos en agua.

### **1.2.1 Hipótesis del Trabajo**

Los resultados cuantitativos de boro, fluoruro y nitrito obtenidos en agua, validado en el Laboratorio Ambiental del OSP proporcionarán valores confiables de concentraciones de estos iones en las muestras procesadas.

## **1.3 OBJETIVO GENERAL**

Validar los métodos analíticos para la determinación de boro, fluoruros y nitritos en agua mediante espectrofotometría de luz visible.

## **1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar boro, fluoruros y nitritos por espectrofotometría de luz visible utilizando los métodos estándares del APHA y las técnicas de los manuales Handbook Merck y HACH respectivamente.
- Determinar los parámetros de validación en los métodos de determinación de boro, fluoruros y nitritos:  
Límite de Detección (LD),  
Límite de Cuantificación (LC),  
Linealidad,  
Repetibilidad (r),  
Reproducibilidad (R) y  
Exactitud
- Estimar la incertidumbre de los resultados.
- Demostrar que el método para la determinación de boro, fluoruros y nitritos es apto para la utilización del mismo en el análisis de muestras de agua.

## 1.5 IMPORTANCIA Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El agua es esencial para la vida por esta razón debemos insistir en la relación entre el agua y la salud. La disponibilidad y la calidad del agua determinan el grado de salud e higiene de cualquier sociedad.

Es importante la validación del método para la determinación de:

- Boro, elemento que existe en forma natural, que se encuentra en aguas y océanos, rocas sedimentarias, carbón y ciertos suelos.
- Fluoruros,” aniones presentes en las aguas naturales subterráneas en forma de sales, así el flúor se encuentra en bebidas y en alimentos en pequeñas cantidades, es considerado como un elemento esencial desde el punto de vista de la nutrición humana, imprescindible para la formación de huesos y dientes”. (Cátedra de Química Analítica General. Fac. de Agroindustrias. U.N.N.E., 2000)
- Nitritos, ión que existe de manera natural en suelos, agua, vegetales y tejidos animales, formando parte del ciclo del nitrógeno.

Si la concentración de boro, fluoruros y nitritos están fuera de los límites aceptados por el INEN 0,5mg/L, 1,5mg/L, 0,2mg/L respectivamente, se vuelven tóxicos y causa diversos efectos sobre la salud, el flúor provoca enfermedades como la fluorosis ósea, los nitritos causan la metahemoglobinemia en niños, de ahí la responsabilidad de los laboratorios de análisis de agua en presentar resultados confiables a sus clientes.

El Laboratorio Ambiental de Oferta de Servicios y Productos (OSP) debe demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para aumentar el grado de acreditación del laboratorio emitido por el OAE, siendo la validación parte fundamental de este proceso, ya que muchas de las decisiones que se toman están basados en la información de estos datos, por ello la importancia de una adecuada validación, la cual establece bajo qué circunstancias deben realizarse los análisis, asegurando que los datos obtenidos cumplen en la totalidad la calidad deseada, tomando en cuenta las normas y los requisitos del INEN para brindar seguridad y respaldo.

## **CAPÍTULO II**

### **2. MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 ANTECEDENTES**

El Laboratorio Ambiental de Oferta de Servicio y Productos (OSP) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador es un laboratorio acreditado por el sistema ecuatoriano de la calidad, Organismo de Acreditación Ecuatoriano OAE, a partir del 22 de julio del 2004, demostrando las competencias técnicas en ensayos con el certificado de acreditación N° OAE LE IC 04-002 (ver anexo A). Además de desempeñarse bajo normas de calidad INEN ISO/IEC 17025:2006 se espera la ampliación del alcance de acreditación con la validación de métodos de determinación de boro, fluoruros y nitritos en agua, para asegurar la calidad y confiabilidad de los resultados analíticos.

Los límites máximos permitidos de boro, fluoruros y nitritos que se encuentran dictaminados por la Norma NTE INEN 1108:2011 Requisitos Agua Potable (ver anexo B) son 0,5mg/L, 1,5mg/L, 0,2mg/L respectivamente.

El OSP cuenta con la tecnología necesaria para llevar a cabo los más complejos procesos analíticos y de esta forma realizar las validaciones de los métodos.

En la determinación de nitritos y boro se utilizó el espectrofotómetro HACH DR2800 que es un espectrofotómetro del espectro visible con un rango de longitud de onda de 340 a 900 nm útil por la rapidez con la que se suministra lecturas digitales en unidades directas de concentración, absorbancia o porcentaje de transmitancia. En la determinación de fluoruros se utilizó el espectrofotómetro MERCK SQ118, de espectro visible.

#### **2.2 FUNDAMENTO TEÓRICO**

##### **2.2.1 Parámetros de calidad**

Son criterios cuantitativos que se utilizan para decidir si un método es adecuado o no para resolver un determinado problema analítico.

##### **2.2.1.1 Aseguramiento de la calidad**

“Conjunto de principios de funcionamiento que si se cumplen estrictamente a lo largo de la toma y el análisis de muestras se asegurará resultados de calidad reconocida y justificable. En



consecuencia podrá declararse con un alto grado de confianza la exactitud del resultado analítico.” (Andrew D. Eaton, 2005)

### **2.2.1.2 Control de calidad.**

“Conjunto de medidas que, según una metodología de análisis de muestras, aseguran que el proceso se encuentra bajo control” (Andrew D. Eaton, 2005), estos, son por lo tanto los criterios que se utilizan en la validación de los métodos analíticos para demostrar su validez en la resolución de un problema analítico.

### **2.2.2 Validación de métodos**

La validación de un método es un requisito necesario en la práctica de los análisis químicos, mediante estudios en el laboratorio, consiste en confirmar y documentar que los resultados y características de desempeño obtenidos de la aplicación de un método de análisis son confiables. “La validación de métodos, es el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado.” (World Health Organization, 2002)

En general, se establece que el laboratorio debe validar:

- *Métodos no normalizados:* Corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos, o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.
- *Métodos estándar o normalizados:* Con una modificación significativa.

Los métodos estándar son aquellos publicados por organizaciones internacionales, regionales o nacionales; por organizaciones técnicas respetables; referencias legales; métodos publicados por la FDA (Food and Drug Administration), y que se ejecutan tal como se describen en la norma.

Aquellos métodos especificados por fabricantes de equipos de análisis también son considerados como métodos estándar, por ejemplo los suministrados por HACH en el Handbook de análisis de agua por métodos espectrofotométricos.

Cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, se puede realizar una **Validación Retrospectiva**, es decir, en base a los datos experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realizará la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, estos datos pueden ser: curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, etc. A través de estos, se deberán determinar los parámetros de validación, y evaluar si los resultados obtenidos para los fines son aceptables.

En caso de ser un método nuevo (o uno antiguo del que no se dispongan de datos suficientes) se debe realizar una **Validación Prospectiva**, generando a través de análisis de datos experimentales.

En algunos casos se puede realizar lo que se conoce como validación menor o **Verificación**, cuyo objetivo es comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y lo utiliza correctamente.

La Validación es necesaria para:

- Demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar
- Demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados.
- Para conocer la incertidumbre

En la figura 1 se esquematiza el ciclo de una validación, en teoría éste se repite indefinidamente debido a los continuos avances instrumentales y/o al desarrollo de nuevas técnicas.

**Figura 2-1** Ciclo de validación



#### **2.2.2.1 Proceso de validación.**

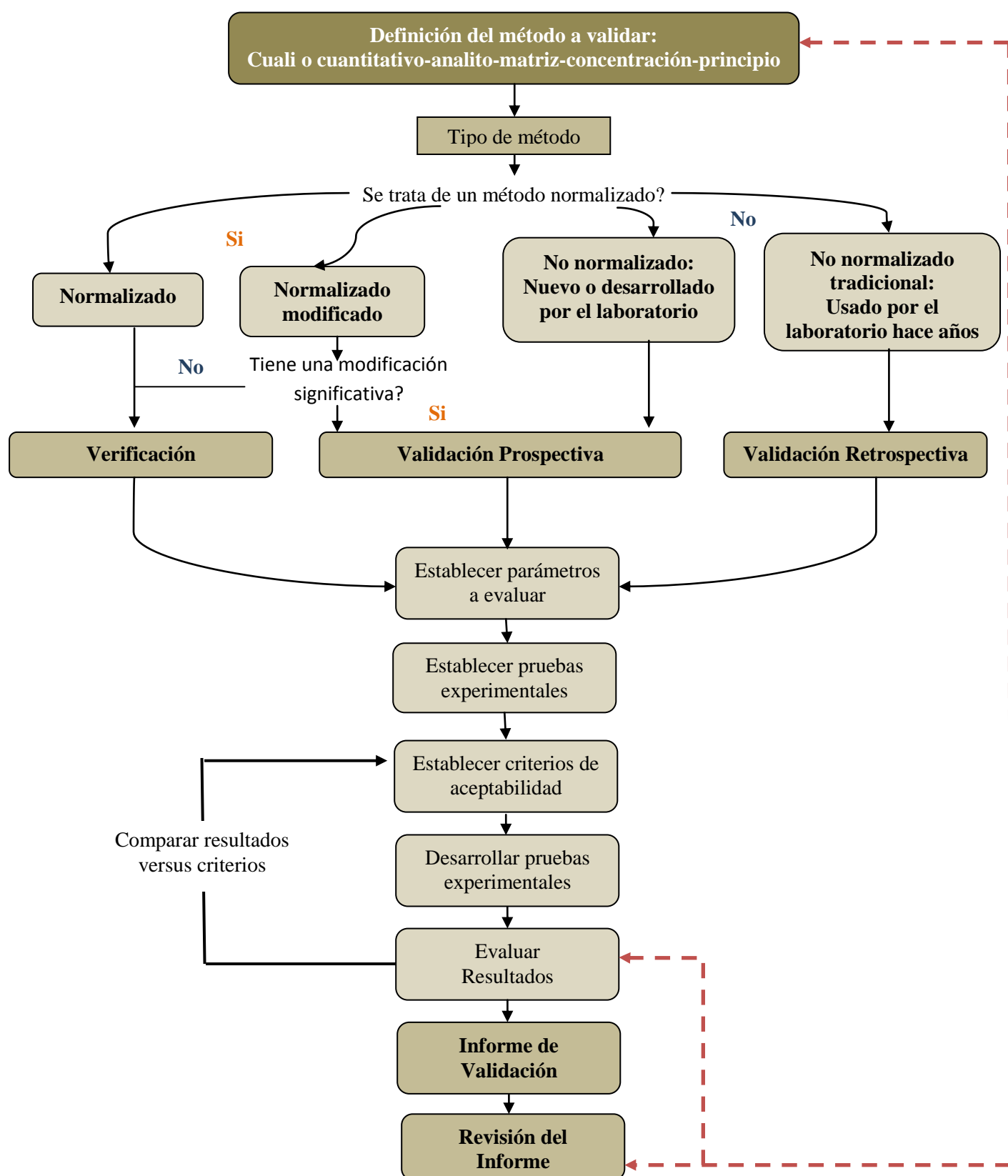
Se sigue el siguiente esquema:

1. Necesidad analítica (Se establece por la autoridad del laboratorio, la necesidad de satisfacción de una demanda analítica).
2. Método (Revisión de métodos disponibles y elección del más apropiado).
3. Borrador del procedimiento (Teniendo en cuenta los aspectos formales del contenido).

4. Puesta a punto (Se ajustan y afinan las distintas variables del método). En este apartado se prueba teniendo en cuenta los diversos parámetros de validación.
5. Elección de los parámetros de validación (Teniendo en cuenta las guías aplicables y la experiencia obtenida con la puesta a punto).
6. Diseño experimental y estadístico (Para la obtención de los parámetros elegidos, siguiendo el procedimiento).
7. Realización de los ensayos diseñados (de acuerdo con el procedimiento borrador. Evidencias registrales completas).
8. Tratamiento estadístico de los datos obtenidos (Se obtienen los valores propios del laboratorio para los parámetros de validación).
9. Hacer declaración del método validado.
10. Guardar registros ordenadamente, aprobar procedimientos y difundir /distribuir.

En la figura 2 se esquematiza el proceso de una validación de acuerdo al tipo de método.

**Figura 2-2.** Diagrama de desarrollo de una validación



**Nota:** (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010).

### 2.2.2.2. *Parámetros de la validación.*

Para demostrar que un método es el adecuado para la aplicación que se pretende es preciso determinar mediante estudios de laboratorio sus características de funcionamiento (parámetros) los cuales deberán determinarse de acuerdo al tipo de método. Para este fin la siguiente tabla puede ser utilizada como guía:

**Tabla 2-1.** Identificación de parámetros

PARÁMETRO A EVALUAR	CARACTERÍSTICA(S)	MÉTODO CUALITATIVO	MÉTODO CUANTITATIVO		
			NORMALIZADO	MODIFICADO	NUEVO
<b>SELECTIVIDAD</b>	Identificación analito Interferencias de matriz	Sí	No	Sí	Sí
<b>LINEALIDAD</b>	Rango lineal	No	Sí	Sí	Sí
<b>SENSIBILIDAD</b>	Pendiente	No	Sí o No	Sí	Sí
<b>LÍMITES</b>	Crítico (LC) Detección (LOD) Cuantificación (LOQ)	Sí	Sí o No	Sí	Sí
<b>PRECISIÓN</b>	Repetibilidad Reproducibilidad	No	Sí	Sí	Sí
<b>VERACIDAD</b>	Sesgo (s) Recuperación (R)	No	Sí o No	Sí o No	Sí
<b>ROBUSTEZ</b>	Test de Youden y Steiner	No	No	Sí o No	Sí
<b>APLICABILIDAD</b>	-----	Sí	Sí	Sí	Sí

**Nota:** (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010, pág. 24)

### **Identificación, Selectividad y Especificidad.**

Confirmar la Identidad es establecer que la señal producida en la medición, o que la propiedad medida que se atribuye al analito, solamente se debe al analito y no a la presencia de algo física o químicamente similar.

- La *selectividad* es “la habilidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones establecidas” ((EURACHEM) a Focus for Analytical Chemistry in Europe, 2005)
- La *especificidad* es “la capacidad de determinar el analito inequívocamente en la presencia de componentes en los cuales se espera que estén presentes” ((EURACHEM) a Focus for Analytical Chemistry in Europe, 2005)

**Selectividad y especificidad son medidas que calculan la fiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias.**

En general, se considera que: especificidad = 100% selectividad.

La validación debe garantizar el buen funcionamiento del método, y que éste distinga los efectos de las impurezas, las sustancias que reaccionan entre sí, etc., que podrían estar presentes en la muestra.

### **Límite de detección (LD)**

Se trata de la concentración mínima de analito que puede ser detectada e identificada, aunque no necesariamente cuantificada con un determinado grado de certidumbre, así como también la concentración mínima que puede distinguirse del ruido de fondo con un determinado grado de confianza.

Para un resultado analítico que es muy cercano al valor del blanco, se plantea la duda de si el valor corresponde a valores aleatorios del blanco o a la presencia real del analito.

Para propósitos de validación el límite de detección se establece con la siguiente fórmula:

$$LD = 3 \times S \quad \text{ec. (1)}$$

Donde:

S= desviación estándar, obtenida de la media y de las lecturas del blanco.

Los valores por encima del LD pueden ser atribuidos a la presencia del analito y los valores por debajo del LD son indicativos de la ausencia de analito en cantidades detectables.

### **Límite de cuantificación (LC).**

El límite de cuantificación es estrictamente la concentración más baja del analito que se puede cuantificar con un nivel de repetibilidad, precisión y exactitud aceptable, y produce una señal lo suficientemente grande como para distinguirse de un blanco.

Se utilizará los mismos datos obtenidos de las lecturas del límite de detección, la diferencia es que para éste la fórmula es la siguiente:

$$LC = 10 \times S \quad \text{ec. (2)}$$

Donde:

S = desviación estándar, obtenida de la media y de las lecturas del blanco.

**Tabla 2-2.** Procedimiento general para evaluar los Límites

Análisis	Repeticiones	Cálculo
<b>LDC:</b> Blancos sin adición de analitos	10 veces	Desviación estándar y LDC
<b>LDC:</b> Blancos con una concentración conocida de analito cercano al LDM	10 veces en mínimo 3 concentraciones.	Desviación estándar Graficar desviación estándar vs concentración LDC por inspección

**Nota:** (Lora, 2009)

Un criterio de aceptación adecuado de los Límites es:

$$LD < LDC < LMP \quad \text{ec. (3)}$$

#### **Intervalo de trabajo e Intervalo lineal.**

Para los métodos cuantitativos es necesario determinar el rango de concentración del analito donde el método debe ser aplicado.

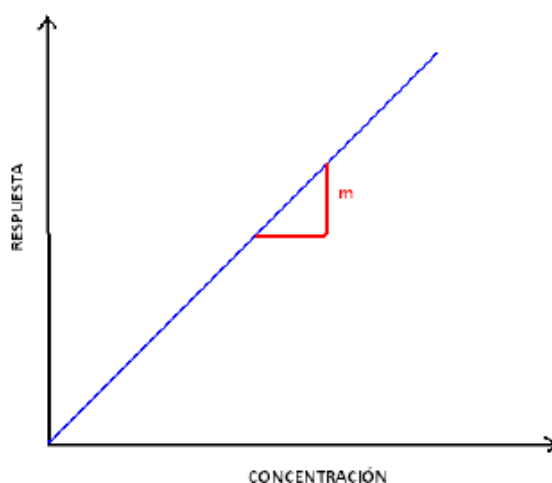
La evaluación de la linealidad es muy útil para determinar qué tipo de calibración es requerido en el uso rutinario del método, este nos puede definir tanto si la curva de calibración requiere solo un punto o tantos como sean necesarios para obtener una regresión adecuada.

La linealidad y rango son dos parámetros muy relacionados, sin embargo el rango se distingue de la linealidad en que éste toma en cuenta además la precisión y la exactitud de los valores obtenidos.

- **Intervalo de trabajo** es “el conjunto de valores medidos para los cuales el error de un instrumento de medición está supuestamente comprendido dentro de ciertos límites” ((EURACHEM) a Focus for Analytical Chemistry in Europe, 2005)

Con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar un gráfico de concentración versus respuesta, que se conoce como **Función Respuesta** normalmente llamada recta de calibrado figura3.

**Figura 2-3.** Comportamiento lineal, Curva de calibración



**Nota:** (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010)

Para realizar la evaluación estadística se define curva de calibración C vs Abs de donde se obtendrá la ecuación de la recta:

$$y = ax + b \quad \text{ec. (4)}$$

Donde:

**x:** es la concentración teórica,

**y:** la respuesta del equipo,

**a=m:** el valor de la pendiente y

**b=lo=intercepto:** la intersección con el eje y o término independiente.

La pendiente a (m), está asociada a la sensibilidad del método, mayor pendiente significa mayor sensibilidad, por otro lado el término independiente (b) está relacionado con el error sistemático del método, su significancia debe ser evaluada para determinar si el error sistemático es representativo.

En general el criterio de aceptación cualitativo que se usa para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación y de determinación.

- **Coefficiente de correlación (r) y determinación ( $r^2$ ):** El coeficiente de correlación (r) nos indica el grado de relación entre la concentración y la respuesta de una curva de calibración. Cuando este parámetro se acerca a un valor de 1, indica una alta relación



lineal entre ambas variables, se recomienda un valor del coeficiente de correlación mayor a 0.999, aunque en el caso de impurezas este podría ser mayor a 0.990.

El coeficiente de determinación ( $r^2$ ), aporta una mayor significancia estadística ya que esta expresa como tal la variación total del modelo lineal. Será establecida por medio del coeficiente de variación ( $r^2 > 0,995$ ), pendiente e intersección con el eje, que se obtenga de la mejor curva de calibración de los diferentes ensayos.

$$r = -\frac{S_{XY}}{S_X * S_Y} \quad \text{ec. (5)}$$

Donde:

$r$ = coeficiente de correlación y;

$$S_{XY} = \frac{\sum_{i=1}^n Xi * Yi}{n} - (Xprom * Yprom) \quad \text{ec. (6)}$$

$$S_X = \sqrt{\left(\sum Xi^2/n\right) - (Xprom^2)} \quad \text{ec. (7)}$$

$$S_Y = \sqrt{\left(\sum Yi^2/n\right) - (Yprom^2)} \quad \text{ec. (8)}$$

Se puede realizar una evaluación de curva de calibración global (construida con más de una curva de calibración de las mismas características) en la cual se puede realizar una evaluación estadística de prueba t-student, como un mejor indicador del modelo lineal. Se calcula un valor de t con (n-2) grados de libertad y se compara con el valor t de tablas para el nivel de confianza requerido ( $\alpha=0.05$ ), dos-colas, en este caso para un “n” que depende de los niveles de calibración.

Se desea probar si existe entonces una correlación significativa:

Hipótesis nula  $H_0$ : no existe correlación entre X e Y.

Hipótesis alternativa  $H_a$ : existe correlación significativa entre X e Y.

Si el valor observado es:

T-calculado, mayor que, t-tablas, se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ , siendo aceptada la  $H_a$  correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

$$t_{calculada} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{ec. (9)}$$

Donde:

$|r|$ = valor absoluto del coeficiente de correlación

$n-2$ = número de grados de libertad

$r^2$ = valor del coeficiente de determinación

En cuanto al rango de aplicabilidad, el *Codex Alimentarius* ha establecido que respecto al límite máximo permitido (LMP) el intervalo mínimo aplicable es:

$$\text{Respecto de un LMP} \geq 0,1 \text{ ppm} \longrightarrow \boxed{\text{LMP} - 3 \text{ SR} / \text{LMP} + 3 \text{ SR}} \quad \text{ec. (10)}$$

$$\text{Respecto de un LMP} < 0,1 \text{ ppm} \longrightarrow \boxed{\text{LMP} - 2 \text{ SR} / \text{LMP} + 2 \text{ SR}} \quad \text{ec. (11)}$$

Siendo:

**SR** = desviación estándar de la reproducibilidad.

### **Sensibilidad.**

Dentro del rango lineal de un método, si se intercepta la curva de respuesta, la sensibilidad es un parámetro útil para calcular y usar en la fórmula de cuantificación, ya que corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración.

A ligeros cambios en las concentraciones habrá grandes variaciones en los resultados de las lecturas observadas y grandes cambios en la concentración no son significativos para la lectura, se dice, que un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta.

La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito.

## **Exactitud.**

**“Grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia”** (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009)

La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios sobre los resultados.

Así, la exactitud se estudia normalmente como **veracidad** y **precisión** que son indicadores de calidad. Entre más veraz y preciso sea un resultado analítico, es más exacto.

- **Veracidad.** Determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado. La veracidad puede ser determinada por sesgo o recuperación.

**Sesgo:** Desviación consistente de valores medidos a partir del valor verdadero, originada por errores sistemáticos durante un procedimiento.

Para determinar el sesgo puede utilizarse material de referencia: se debe medir un analito de concentración conocido y se determina la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la media del valor obtenido. Una diferencia sistemática importante en relación al valor de referencia aceptado se refleja en un mayor valor del sesgo, cuanto más pequeño es el sesgo, mayor veracidad indica el método.

$$s = X - X_a \quad \text{ec. (12)}$$

Donde:

**s** = sesgo

**X** = lectura obtenida o valor promedio de las lecturas obtenidas.

**X<sub>a</sub>** = valor asignado, valor certificado del material de referencia o valor esperado.

**Recuperación:** Es la fracción de la sustancia agregada a la muestra (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar. La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico.

Se calcula de la siguiente manera:

$$\%R = \frac{x * 100}{X} \quad \text{ec. (13)}$$

Siendo:

**%R** = Porcentaje de recuperación

**x** = valor proporcionado por un determinado laboratorio

**X** = valor asignado en el Material de referencia

En caso de evaluar la recuperación, se deberá realizar prueba t-student, en la cual la t calculada < t tabla:

$$t_{calc} = \frac{[100 - \%R]}{S * \sqrt{n}} \quad \text{ec. (14)}$$

Donde:

**%R**= porcentaje de recuperabilidad

**S** = Desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación

**n** = número de lecturas

Se buscar t-student teórico en tabla (ver anexo C) para grados de libertad (v) y el porcentaje de seguridad deseado (1- $\alpha$ ) para un error  $\alpha$  de 0,05, es decir con un 95% de confianza.

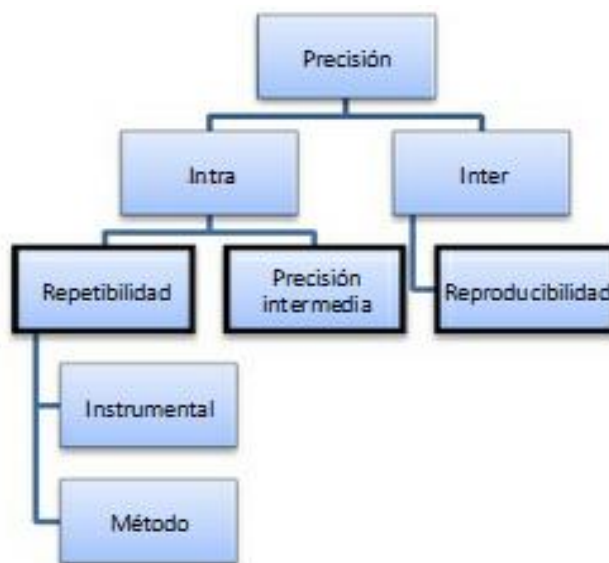
Si el  $t_{calc} > t_{tab}$ . hay diferencia estadísticamente significativa, los resultados reportados deberán ser corregidos.

Si el  $t_{calc} \leq t_{tab}$ . no hay diferencia estadísticamente significativa, no es necesario ninguna corrección.

En caso que se cuente con un Material de Referencia Certificado (MRC) utilizar el rango de aceptabilidad señalado en el certificado como criterio de aceptabilidad. Es decir, el valor determinado analíticamente deberá encontrarse dentro del rango de tolerancia establecido a través de certificado.

- **Precisión.** Medida del grado de concordancia entre análisis repetidos de una muestra expresada generalmente como la desviación estándar, que describe la dispersión de los resultados.

**Figura 2-4.** Jerarquía de los niveles de precisión



**Nota:** (Lora, 2009, pág. 48)

Las dos medidas de precisión más comunes son **repetibilidad** y **reproducibilidad**, que representan los dos extremos de la precisión que se pueden obtener.

**Repetibilidad:** La más pequeña precisión esperada. Da una idea del tipo de variabilidad que se puede esperar cuando el método es desarrollado por un mismo analista en un mismo equipo a lo largo de un periodo de tiempo corto, en el mismo método.

**Reproducibilidad:** La precisión más grande esperada. Una muestra analizada por varios laboratorios, con diferentes analistas.

Generalmente la precisión se establece en términos de desviación estándar (S) y en porcentaje de coeficiente de variación (CVr%) debido a que a partir de ellas se pueden calcular los límites de repetibilidad y de reproducibilidad que permitan al analista saber si la diferencia entre los análisis duplicados es significativa, en las condiciones del método establecidas.

El criterio de aceptabilidad para la precisión se puede hacer en base a coeficiente de variación de Horwitz :

$$CVh\% = 2^{(1-0.5 \log C)} \quad \text{ec. (15)}$$

$$S_H = 0,02 \times C^{0.8495} \quad \text{ec. (16)}$$

Donde:

**CVh** = Coeficiente de variación de Horwitz

**S<sub>H</sub>** = Desviación estándar calculada conforme al modelo de precisión de Horwitz

**C**= valor nominal del analito expresado en potencia de 10.

En caso que se desee se puede realizar el estudio de reproducibilidad y repetibilidad, a través de la prueba F y un análisis de varianza ANOVA que consiste en el análisis simple de varianza de las desviaciones estándar para cada uno de los niveles de ensayo.

### **Prueba F (Fisher) y Análisis de varianza (ANOVA)**

Prueba F, el estadístico utilizado sigue una distribución F si la hipótesis nula no puede ser rechazada.

**Hipótesis nula=H<sub>0</sub>** medias de múltiples poblaciones normalmente distribuidas y con la misma desviación estándar son iguales

Cálculo de F:

$$F = \frac{S^2_{mayor}}{S^2_{menor}} \quad \text{ec. (17)}$$

Donde:

**S<sup>2</sup>**= Varianza de los datos

El análisis de varianza, también conocido como ANOVA, es el análisis estadístico en el cual se compara más de dos medias entre sí.

Para ese fin, se debe proceder a comparar las diferencias entre cada grupo y las observaciones realizadas.

En la tabla 3 se sintetizan las ecuaciones usadas en este tratamiento estadístico:

**Tabla 2-3.** Ecuaciones para el análisis de varianza en una regresión lineal

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	Estadístico
<b>Regresión</b>	$SC_{REG} = \sum ni(\hat{y}_i - \bar{y})^2$	1	$V_{REG} = \frac{SC_{REG}}{1}$	$F1 = \frac{V_{REG}}{V_{RES}}$
<b>Residual</b>	$SC_{RES} = \sum (\hat{y}_i - y_i)^2$	n - 2	$V_{RES} = \frac{SC_{RES}}{n - 2}$	
<b>Falta de ajuste</b>	$SC_{FA} = \sum ni(\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	k - 2	$V_{FA} = \frac{SC_{FA}}{k - 2}$	$F2 = \frac{V_{FA}}{V_{EXP}}$
<b>Error Experimental</b>	$SC_{EXP} = \sum \sum (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$\sum ni - k$	$V_{EXP} = \frac{SC_{RES}}{\sum ni - k}$	
<b>Total</b>	$SC_T = \sum \sum (y_{ij} - \bar{y})^2$	$\sum ni - 1$	$V_T = \frac{SC_T}{\sum ni - 1}$	

Donde:

i = número del grupo

j = número de la serie

$\bar{y}$  = media de y

$\bar{x}$  = media de x

n = número total de lecturas

ni = número de réplicas en un grupo

k = número de grupos o concentraciones

Una vez comprobados los supuestos y calculados los estadísticos  $F_1$  y  $F_2$  se procede a verificar las siguientes hipótesis:

- ✓  $F_{1,exp} > F_{1, tablas}$  demuestra la existencia de una pendiente distinta a 0, hay diferencia significativa.
- ✓  $F_{2,exp} < F_{2, tablas}$  demuestra la linealidad entre los resultados obtenidos, no hay diferencia significativa.

Los valores F se obtienen de las tablas de Fisher-Snedecor de acuerdo a los grados de libertad correspondientes y a un grado de significancia de 0.05. (ver anexo D)

- **Pruebas de aptitud.** Parte de la estrategia del Programa de Calidad es la evaluación regular de la capacidad técnica de un laboratorio para asegurar la validez de los ensayos.

**“Proficiency Tests”(PTs) MRC:** El objetivo es Evaluar las incertidumbres de los ensayos de exactitud y precisión, utilizando un métodos estadísticos:

- ✓ Valor asignado: valor atribuido, y aceptado, a una cantidad particular, así como su incertidumbre.
- ✓ Desviación estándar del PT: medida de la dispersión de los valores obtenidos por los laboratorios, basada en la información disponible.
- ✓ z-score: medida estandarizada de la desviación de un laboratorio, calculada utilizando el valor asignado y la desviación estándar del PT.
- ✓ Coordinador: organización (o persona) responsable para coordinar todas las actividades involucradas en el PT.

$$Z = \frac{x - X}{Sp} \quad \text{ec. (18)}$$

Donde:

**Z:** Z-score

**x:** valor proporcionado por un determinado laboratorio

**X:** valor asignado en el PT

**Sp:** desviación estándar del PT

### **Robustez.**

La *robustez* de un método analítico es una medida de su capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal. Las pruebas de robustez se aplican normalmente para investigar su efecto en la precisión y exactitud del método.

Un método de ensayo es más robusto entre menos se vean afectados sus resultados frente a una modificación de las condiciones analíticas, para proceder a realizar el estudio de robustez se deben identificar aquellos factores del método que posiblemente afectarían los resultados finales.

### **Aplicabilidad.**

La aplicabilidad consiste en una declaración de las especificaciones del rendimiento del método que se entrega en el informe de validación, una vez concluida.



### 2.2.2.3 Incertidumbre.

**Parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando,** en este sentido, es importante que para un método validado por el laboratorio, se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición que pueden afectar directamente al método y pueden ser evaluados de distintas maneras.

Las formas de evaluar la incertidumbre estándar son: tipo A y tipo B

**Tipo A:** Se relaciona con fuentes de error aleatorios, y pueden ser evaluados a partir de distribuciones estadísticas de series de resultados, que pueden caracterizarse por desviaciones estándar.

$$\mu = \frac{S \text{ promedio}}{\sqrt{3}} \text{ ec. (19)}$$

Donde:

$\mu$ = Incertidumbre

S= Desviación estándar promedio

- **Incertidumbre de exactitud:** La incertidumbre se evaluará en base a los estudios de la **repetibilidad y reproducibilidad** que se obtengan de la validación, en los rangos de medición: bajo, medio y alto para cada analito.

**Tipo B:** No se determina por medios estadísticos, están asociadas a los errores de tipo sistemático; esto es, se estiman a partir de datos del fabricante del instrumento, especificaciones, certificados de calibración, y en general de datos subjetivos.

- **Incertidumbre debida a los equipos de medición:** La incertidumbre de calibración de los equipos se determinará de acuerdo a la información presente en los certificados de calibración de cada equipo. Se tomará en cuenta para este tipo de incertidumbre los equipos y materiales cuyas mediciones afectan directamente al resultado.

- ✓ Balanza
- ✓ Espectrofotómetro DR2800 HACH.
- ✓ Espectrofotómetro SQ118 MERCK.
- ✓ Pipetas y material de vidrio

**Parámetros para la estimación de la incertidumbre.** La incertidumbre representa el intervalo en el que se puede encontrar el valor verdadero con mayor probabilidad.

Los parámetros para la estimación de incertidumbre son: incertidumbre estándar, incertidumbre estándar combinada e incertidumbre expandida.

- **Incertidumbre estándar:  $\mu(y')$**

Cada componente de la incertidumbre ( $y'$ ), expresada como desviación estándar.

- **Incertidumbre estándar Combinada:  $\mu_c(y)$**

Para el resultado  $y$  (Ley de propagación de errores)

*Reglas para el cálculo de la incertidumbre combinada:*

**Regla 1:** Sumas y restas:  $y : a + b + c + \dots$

$$\mu(y) = \sqrt{\mu(a)^2 + \mu(b)^2 + \mu(c)^2 + \dots} \quad \text{ec. (20)}$$

**Regla 2:** Productos y cocientes:  $y = abc$  o  $y = a/bc$

$$\frac{\mu(y)}{y} = \sqrt{\left[\frac{\mu(a)}{a}\right]^2 + \left[\frac{\mu(b)}{b}\right]^2 + \left[\frac{\mu(c)}{c}\right]^2} \quad \text{ec. (21)}$$

**Regla 3:** Exponentes:  $y = a^n$

$$\frac{\mu(y)}{y} = n \frac{\mu(a)}{a} \quad \text{ec. (22)}$$

- **Incertidumbre expandida  $U$ .** Proporciona un intervalo dentro del cual se cree que está el valor del mesurando, cuando por razones de seguridad o salud se necesite expresar la incertidumbre con un alto nivel de confianza, se multiplica esta incertidumbre combinada por un factor de cobertura o seguridad  $K$ .

$$U = K \mu_c(y) \quad \text{ec. (23)}$$

$K$ = factor de seguridad o de cobertura. Para un nivel de confianza del 95%, se considera un valor de  $K$  igual a 2.

### 2.2.3 El Agua

El agua, al mismo tiempo que constituye el líquido más abundante en la Tierra, representa el recurso natural más importante y la base de toda forma de vida.

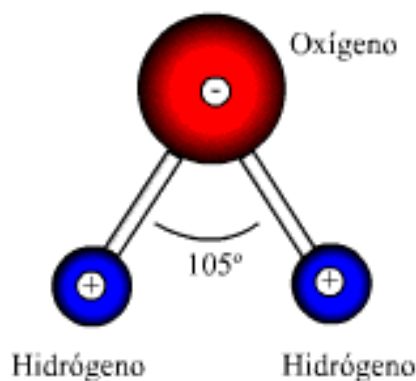
Ocupa tres cuartas partes de la superficie del planeta, y en el cuerpo humano existe un 75 % de agua al nacer y cerca del 60 % en la edad adulta, el organismo pierde agua por distintas vías la misma que ha de ser recuperada con la ingesta y evitando así la deshidratación.

El agua puede ser considerada como un recurso renovable cuando se controla cuidadosamente su uso, tratamiento, liberación, circulación, de lo contrario es un recurso no renovable en una localidad determinada.

#### 2.2.3.1 Estructura del agua.

El agua tiene una estructura molecular simple, está compuesta por un átomo de oxígeno y dos de hidrógeno ( $H_2O$ ), cada átomo de hidrógeno se encuentra unido covalentemente al oxígeno por medio de un par de electrones de enlace formándose entre ellos un ángulo de  $104'5''$ . El oxígeno tiene además dos pares de electrones no enlazantes, y es un átomo electronegativo o "amante" de los electrones, a diferencia del hidrógeno.

**Figura 2-5.** Estructura molecular del  
agua



**Nota:** (Donald Voet, 2006)

No es usual encontrar el agua pura en forma natural, aunque en el laboratorio puede llegar a obtenerse o separarse en sus elementos constituyentes.

### 2.2.3.2 Propiedades del agua.

Las peculiares propiedades físicas y solventes del agua provienen de gran parte de su cohesión interna y extraordinaria cuando se la compara con cualquier otro líquido.

#### Propiedades

- **Acción Disolvente;** el agua es el líquido que más sustancias disuelve, por eso decimos que es el disolvente universal. Esta propiedad, es tal vez la más importante para la vida, se debe a su capacidad para formar puentes de hidrógeno con otras sustancias, ya que estas se disuelven cuando interaccionan con las moléculas polares del agua. La capacidad disolvente es la responsable de que sea el medio donde ocurren las reacciones del metabolismo.
- **Fuerza de cohesión;** los puentes de hidrógeno son los responsables de esto, pues mantienen la molécula fuertemente unida de forma muy compacta.
- **Elevada fuerza de adhesión;** De nuevo los puentes de hidrógeno del agua son los responsables, al establecerse entre estos y otras moléculas polares, y es responsable, junto con la cohesión, de la capilaridad, a la cual se debe, en parte, la ascensión de la sabia bruta desde las raíces hasta las hojas.
- **Gran calor específico;** el agua absorbe grandes cantidades de calor que utiliza en romper los puentes de hidrógeno. Su temperatura desciende más lentamente que la de otros líquidos a medida que va liberando energía al enfriarse. Esta propiedad permite al citoplasma acuoso servir de protección para las moléculas orgánicas en los cambios bruscos de temperatura.
- **Elevado calor de vaporización;** para evaporar el agua, primero hay que romper los puentes de hidrógeno establecidas entre las moléculas de agua líquida y posteriormente dotar a las moléculas de agua de la suficiente energía cinética para pasar de la fase líquida a la gaseosa. Para evaporar un gramo de agua se precisan 540 calorías, a una temperatura de 20° C y presión de 1 atmósfera.
- **Elevada constante dieléctrica;** Por tener moléculas bipolares, el agua es un gran medio disolvente de compuestos iónicos, como las sales minerales, y de compuestos covalentes polares como los glúcidos.

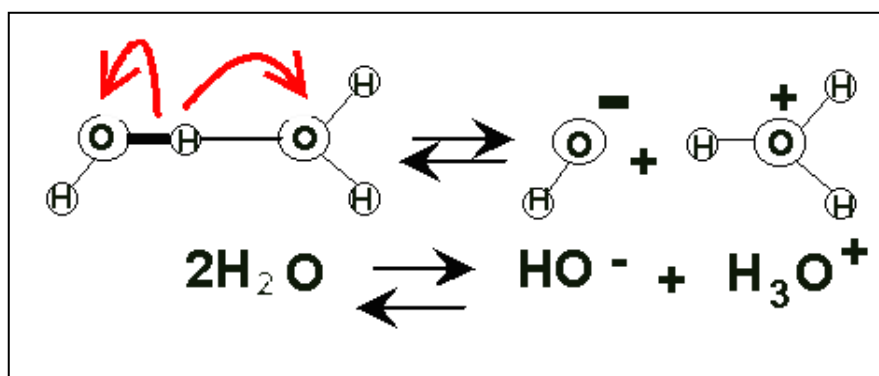
Las moléculas de agua, al ser polares, se disponen alrededor de los grupos polares del soluto, llegando a desdoblar los compuestos iónicos en aniones y cationes, que quedan así rodeados por moléculas de agua. Este fenómeno se llama solvatación iónica.

- **Bajo grado de ionización;** El agua pura tiene la capacidad de disociarse en iones, por lo que en realidad se puede considerar una mezcla de:

Agua molecular ( $\text{H}_2\text{O}$ ), Protones hidratados ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ), llamados también iones hidronio o iones hidrógeno, o simplemente  $\text{H}^+$ , el ione hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ).

(Donald Voet, 2006)

**Figura 2-6.** Grado de ionización del agua



**Nota:** (Almazora, 2003)

De cada 107 moléculas de agua, sólo una se encuentra ionizada, esto explica que la concentración de iones hidronio (H<sup>+</sup>) y de los iones hidroxilo (OH<sup>-</sup>) sea muy baja. Dados los bajos niveles de H<sup>+</sup> y de OH<sup>-</sup>, si al agua se le añade un ácido o una base, aunque sea en poca cantidad, estos niveles varían bruscamente.

### **2.2.3.3 El Agua en la Tierra.**

Reparto del agua en la corteza terrestre:

- 97% Océanos y mares; El agua salada sirve de medio para la vida marina y participa en el ciclo térmico de regulación de la temperatura de la Tierra.
- 3% Agua dulce; es la fuente de agua para el consumo humano, de los cuales:
  - 75% Hielos, glaciares.
  - 24% Acuíferos.
  - 0,03% Ríos.
  - 0,06% Humedad del suelo.
  - 0,3% Lagos.
  - 0,035% Vapor.

El agua pura útil forma parte de los ríos, lagos y acuíferos, el resto está como agua salada constituyendo los océanos en forma de disolución salina que la hace no útil para la actividad humana.

**Agua subterránea.** El agua del subsuelo es un recurso importante y de este se abastece a una tercera parte de la población mundial, se aloja en los acuíferos bajo la superficie de la tierra.

**Aguas superficiales.** El agua superficial es aquella que se encuentra circulando o en reposo sobre la superficie de la tierra. Estas masas de agua sobre la superficie de la tierra, forma ríos, lagos, lagunas, pantanos, charcas, humedales, y otros similares, sean naturales o artificiales. El agua superficial es la proveniente de las precipitaciones, que no se infiltra ni regresa a la atmósfera por evaporación o la que proviene de manantiales o nacimientos que se originan de las aguas subterráneas.

#### **2.2.3.4 Agua Potable.**

Se denomina agua potable o agua para consumo humano, al agua que viene de diversas fuentes que ha pasado por un proceso de purificación para que pueda ser consumida sin restricción debido a que no representa un riesgo para la salud, el término se aplica al agua que cumple con las normas de calidad promulgadas por las autoridades locales e internacionales.

Desde las plantas potabilizadoras, el agua es enviada hacia nuestras casas a través de una red de tuberías que llamamos red de abastecimiento o red de distribución de agua.

#### **Potabilización**

- **Precloración y floculación:** Después de un filtrado inicial para retirar los fragmentos sólidos de gran tamaño, se añade cloro (para eliminar los microorganismos del agua) y otros productos químicos para favorecer que las partículas sólidas precipiten formando copos (flóculos).
- **Decantación:** En esta fase se eliminan los flóculos y otras partículas presentes en el agua.
- **Filtración:** Se emplea para obtener una mayor clarificación y generalmente se hace pasar el agua por sucesivos filtros para eliminar la arena y otras partículas que aún pudieran quedar, eliminando a la vez la turbidez del agua.
- **Cloración y envío a la red:** Para eliminar los microorganismos más resistentes y para la desinfección de las tuberías de la red de distribución.

El cloro es indudablemente el elemento más importante que existe para la desinfección del agua.

Se suele usar en una dosis de 0,0001% que destruye todos los microbios en cuatro minutos.

#### **2.2.4 Analitos**

##### **2.2.4.1 Boro**

El boro ( $B^-$ ) es un elemento que existe de forma natural en el medio ambiente, se combina con el oxígeno y otros elementos para formar compuestos conocidos como boratos, estos están presentes en los océanos, las rocas sedimentarias, el carbón, y algunos suelos. Se obtiene principalmente a partir de minas de boro situadas en regiones áridas y puede aparecer naturalmente en algunas aguas por sustancia procedente de compuestos para limpieza o aguas residuales industriales.

“Aunque el boro es un micronutriente esencial para el crecimiento de las plantas, un exceso de dicho elemento por encima de 2,0 mg/L en el agua de riego es perjudicial para determinados vegetales y puede afectar a algunos en concentraciones del orden de 1,0mg/L (o incluso menos en los invernaderos). El agua potable rara vez contiene más del 1mgB/L y generalmente se considera que las concentraciones inferiores a 0,1mg/L son inocuas para el consumo humano. El agua de mar contiene aproximadamente 5mgB/L.

La ingestión de grandes cantidades de boro puede afectar al sistema nervioso central, la ingestión prolongada puede dar lugar a un síndrome clínico denominado borismo”. (Andrew D. Eaton, 2005)

**Límite máximo permitido de boro (B) en agua potable: 0,5mg/L INEN (ver anexo B)**

#### **2.2.4.2 Fluoruro**

El flúor (F) es el primer elemento de la familia de los halógenos y el elemento químico más reactivo. El término "fluoruro" hace referencia a los compuestos que contienen el ión fluoruro (F<sup>-</sup>) y "fluoruros" hace referencia a los compuestos que contienen fluoruro, ya sean orgánicos o inorgánicos.

El flúor no se puede encontrar como tal en la naturaleza. Sin embargo, los fluoruros son compuestos naturales que están en todas partes: en el suelo, el aire, el agua así como en las plantas y los animales.

Los fluoruros son importantes químicos industriales con gran número de usos, los más comunes son para la producción de aluminio, la fabricación de químicos especiales para la refrigeración y el aire acondicionado por fluorocarbonos, la fluoración de agua de bebida y la fabricación de una variedad de productos dentales fluorados, así como también a menudo se añaden fluoruros a los suministros de agua potable.

Los fluoruros liberados al aire por volcanes y la industria son transportados por el viento y la lluvia a aguas, suelo y fuentes de alimentos cercanas, estos se acumulan en plantas y en animales, en los últimos el fluoruro se acumula principalmente en los huesos.

Los fluoruros inorgánicos son los más importantes por la exposición ambiental, a través del agua y los alimentos. Cuando el nivel de fluoruros excede los límites recomendados puede producirse fluorosis.” En casos raros la concentración natural de fluoruros puede acercarse a 10mg/L; esas aguas deberían defluorarse”. El mantenimiento de su concentración óptima es esencial para conservar la eficacia y seguridad del procedimiento de fluoración.” (Andrew D. Eaton, 2005)

**Límite máximo permitido de fluoruro (F<sup>-</sup>) en agua potable: 1,5mg/L INEN (ver anexo B)**

#### **2.2.4.3 Nitritos**

“El nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) es un estado intermedio de la oxidación del nitrógeno (N), tanto en la oxidación del amoníaco (NH<sub>3</sub>) a nitrato como en la reducción del nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). La reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

puede llevarse a efecto por la acción bacteriana, esa oxidación y reducción puede ocurrir en las plantas de tratamiento de agua residuales, sistema de distribución del agua, y aguas naturales.

El nitrito puede pasar al sistema de suministro de agua debido a su uso como inhibidor de la corrosión en el agua para procesos industriales.” (Andrew D. Eaton, 2005)

El agua que contenga  $\text{NO}_2^-$  puede considerarse sospechosa de una contaminación reciente por materias fecales. Algunas aguas, debido a los terrenos por donde discurren o a las condiciones de almacenamiento pobre en  $\text{O}_2$  pueden presentar cierto contenido de  $\text{NO}_2^-$ .

Los  $\text{NO}_2^-$  existentes en el agua pueden tener un efecto perjudicial sobre la salud de quien la consume; sobre todo en niños, porque los  $\text{NO}_2^-$  son responsables de la formación de metahemoglobina, dando lugar a metahemoglobinemia, y por lo tanto a asfixia interna. El ácido nitroso, formado a partir de nitritos en soluciones ácidas, puede reaccionar con aminas secundarias dando lugar a nitrosaminas, muchas de las cuales son agentes cancerígenos reconocidos.

En lo que respecta a la vigilancia de las aguas de consumo público, la determinación cualitativa o cuantitativa del  $\text{NO}_2^-$  nos permite detectar posibles variaciones de calidad, ya que la presencia de  $\text{NO}_2^-$  es un buen indicador de la contaminación.

**Límite máximo permitido de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en agua potable:** 0,2mg/L INEN (ver anexo B)

## 2.2.5 Espectrofotometría

“Las interacciones de la radiación con la materia es la *espectroscopia*.

Los métodos analíticos espectroscópicos se fundamentan en medir la cantidad de radiación que producen o absorben las especies moleculares o atómicas de interés.” (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2005)

### 2.2.5.1 Radiación Electromagnética.

“Es una forma de energía que se trasmite por el espacio a enorme velocidad. Se denomina luz a la radiación electromagnética en las regiones del UV/visible, y en ocasiones la región IR.” (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2005)

**Tabla 2-4.** Regiones del espectro

<b>Regiones del espectro UV, visible e IR</b>	
<b>Región</b>	<b>Intervalo de longitudes de onda</b>
UV	180–380 nm
Visible	380–780 nm
IR cercano	0.78–2.5 $\mu\text{m}$
IR medio	2.5–50 $\mu\text{m}$

**Nota:** Fundamentos de Química analítica, SKOOG, 8a ed.



“Los métodos espectro químicos en los que se emplea no solo la luz visible, sino también la ultravioleta e infrarroja, se llaman **métodos ópticos** pese a que el ojo humano no es sensible a los dos últimos tipos de radiación mencionados.” (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2005)

### 2.2.5.2 Espectroscopia de absorción.

“En la espectroscopia de absorción, se mide la cantidad de luz absorbida en función de la longitud de onda, lo que proporciona información cuantitativa y cualitativa de la muestra.

La absorción de la radiación atenúa (disminuye la energía por unidad de área) un haz de radiación.

La ley de absorción llamada **Ley de Beer**, indica cuantitativamente la forma en que el grado de atenuación depende de la concentración de las moléculas absorbentes y de la longitud del trayecto en el que ocurre la absorción.” (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2005)

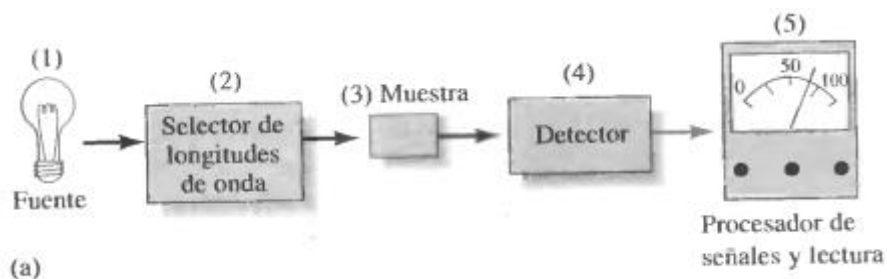
### 2.2.5.3 Espectrofotómetro.

Un espectrofotómetro es un instrumento usado en el análisis químico que sirve para medidas de absorción en función de la longitud de onda, tiene la capacidad de proyectar un haz de luz monocromática a través de una muestra y medir la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra, también es utilizado en los laboratorios de química para la cuantificación de sustancias y microorganismos.

Hay varios tipos de espectrofotómetros, la mayoría de estos instrumentos cubren la región UV/visible y a veces la infrarroja cercana, mientras que los fotómetros se emplean más comúnmente para región visible.” La mayoría de estos equipos tienen hasta cinco componentes:

1. Una fuente estable de energía radiante;
2. Un selector de longitud de onda que aísla una región limitada del espectro para su medida;
3. Uno o varios recipientes con muestras;
4. Un detector de radiación que convierte la energía radiante en una señal eléctrica medible; y
5. Una unidad de procesamiento y lectura de señales que habitualmente consiste en un equipo electrónico y un computador en los instrumentos más modernos.” (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2005)

**Figura 2-7.** Componentes de instrumentos de espectroscopia óptica



**Nota:** (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2005)

**Espectrofotómetro de HACH.** El espectrofotómetro DR 2800 es un espectrofotómetro del espectro UV/Visible, con un rango de longitud de onda de 340 a 900 nm, ancho de banda espectral  $< 8\text{nm}$ , exactitud de longitud de onda de  $\pm 1,5\text{nm}$ , y una lámpara de Tungsteno, para análisis de laboratorio y de campo.

El espectrofotómetro DR 2800 suministra lecturas digitales en unidades directas de concentración, absorbancia o porcentaje de transmitancia.

**Fotografía 1:** Espectrofotómetro  
HACH DR2800



**Nota:** Este equipo se encuentra en el laboratorio ambiental de Oferta de Servicios y Productos (OSP)

**Fotómetro de MERCK.** El fotómetro de MERCK SQ118 es un fotómetro del espectro visible, con un rango de longitud de onda de 340 a 720nm, para análisis de laboratorio y de campo, con uso de diferentes cubetas.

**Fotografía 2:** Espectrofotómetro MERCK  
SQ 118



**Nota:** Este equipo se encuentra en el laboratorio ambiental de Oferta de Servicios y Productos (OSP)

### 2.3 FUNDAMENTO LEGAL

Los documentos oficiales que se utilizaron para el desarrollo de la validación de los métodos para la determinación de boro, fluoruros y nitritos en agua potable son:

- APHA, STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 21 EDITION 2005.
- Instructivo de Toma y Preservación de Muestras.
- Instructivo de Operación de la balanza;
- Instructivo de operación del SQ118 (MERCK) para la determinación de fluoruros.
- SPECTROPHOTOMETER HANDBOOK HACH e instructivo de Operación del Espectrofotómetro DR2800 para la determinación de boro y nitritos.

El límite mínimo y máximo de concentración de boro, fluoruros y nitritos en agua potable que se utilizaron para la validación están basados en los límites permitidos que se encuentran publicados en:

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN INEN  
NTE INEN 1108:2011 Agua potable requisitos (ver anexo B)

Los aspectos formales y de calidad que rigen el procedimiento de validación, requisito para la acreditación de los laboratorios, se basan en:

EL ORGANISMO DE ACREDITACIÓN OAE  
NORMA NTE INEN-ISO/IEC 17025: 2005 (Norma Internacional). Criterios *Generales de Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración*. OAE CR GA01 R00 (ver anexo E)

## **CAPÍTULO III**

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN**

Esta investigación fue de tipo experimental cuantitativa y estadística.

Previamente se realizó una consulta de la teoría de la validación y de los métodos que se utilizaron para la determinación espectrofotométrica de boro, fluoruros y nitritos en agua potable, basados en métodos normalizados Standard Methods del APHA, técnicas de los manuales Handbook spectrophotometer HACH y MERCK además de los publicados en libros estadísticos, libros de Química Instrumental, en internet, en documentos legales como la Norma INEN 1108:2011 Requisitos Agua Potable.

Se procedió a la recolección de datos en el Laboratorio Ambiental de Ofertas de Servicios y Productos (OSP) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.

Obtenidos los datos experimentales se realizó los cálculos y el tratamiento estadístico en el programa Microsoft Excel para la elaboración de las tablas y gráficos, de esta manera se validó los métodos para la determinación de boro, fluoruros y nitritos medidos espectrofotométricamente para aumentar el alcance de la acreditación del laboratorio.

#### **3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA**

En esta validación la población son las soluciones madres de donde se prepararon estándares con diferentes concentraciones, lo que nos indica que es un muestreo probabilístico, siendo la muestra cantidades o alícuotas de cada solución que se tomaron para realizar las mediciones ya que no se trabajó directamente con muestras de agua sino con estándares preparados en diferentes concentraciones de los iones boro, fluoruros y nitritos, que sirvieron para realizar curvas de calibración y se utilizó estándares certificados como un MRC (material de referencia certificado) para comprobar la eficacia del método.

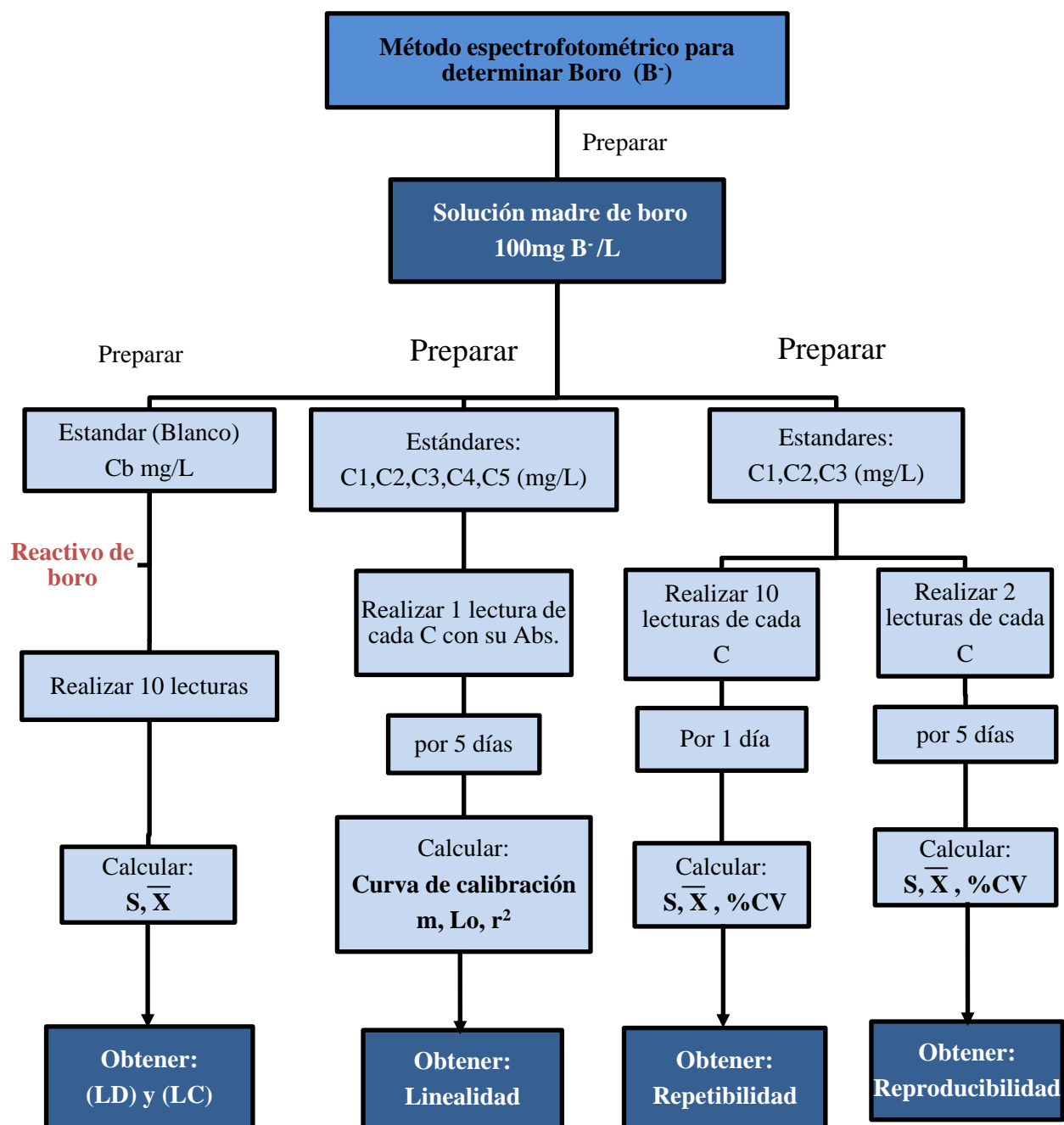
#### **3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se utilizó los métodos para la determinación de boro, fluoruros, y nitritos preparando previamente estándares con concentraciones conocidas, procediendo a la lectura espectrofotométrica y al análisis estadístico correspondiente a cada parámetro de validación.

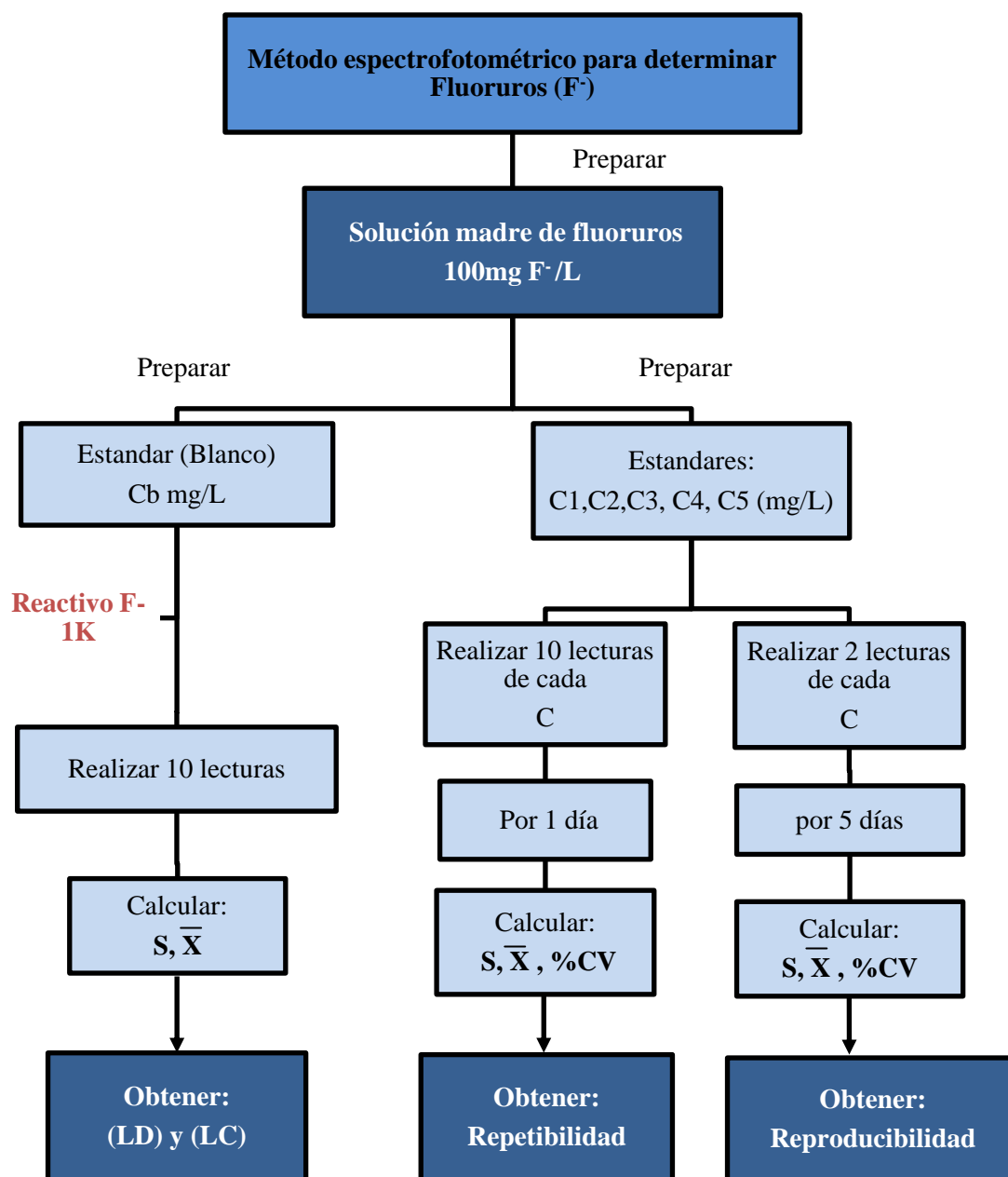
### **3.3.1 Diseño de la validación**

- Se aplicó la metodología para la determinación de boro de acuerdo al esquema de la figura 8 utilizando para las lecturas el espectrofotómetro HACH DR 2800,
- Para la determinación de fluoruros como se muestra en la figura 9 se utilizó para las lecturas el fotómetro SQ118 de MERCK y,
- Para la determinación de nitritos como se indica en la Figura 10, utilizando para las lecturas el espectrofotómetro de HACH DR 2800

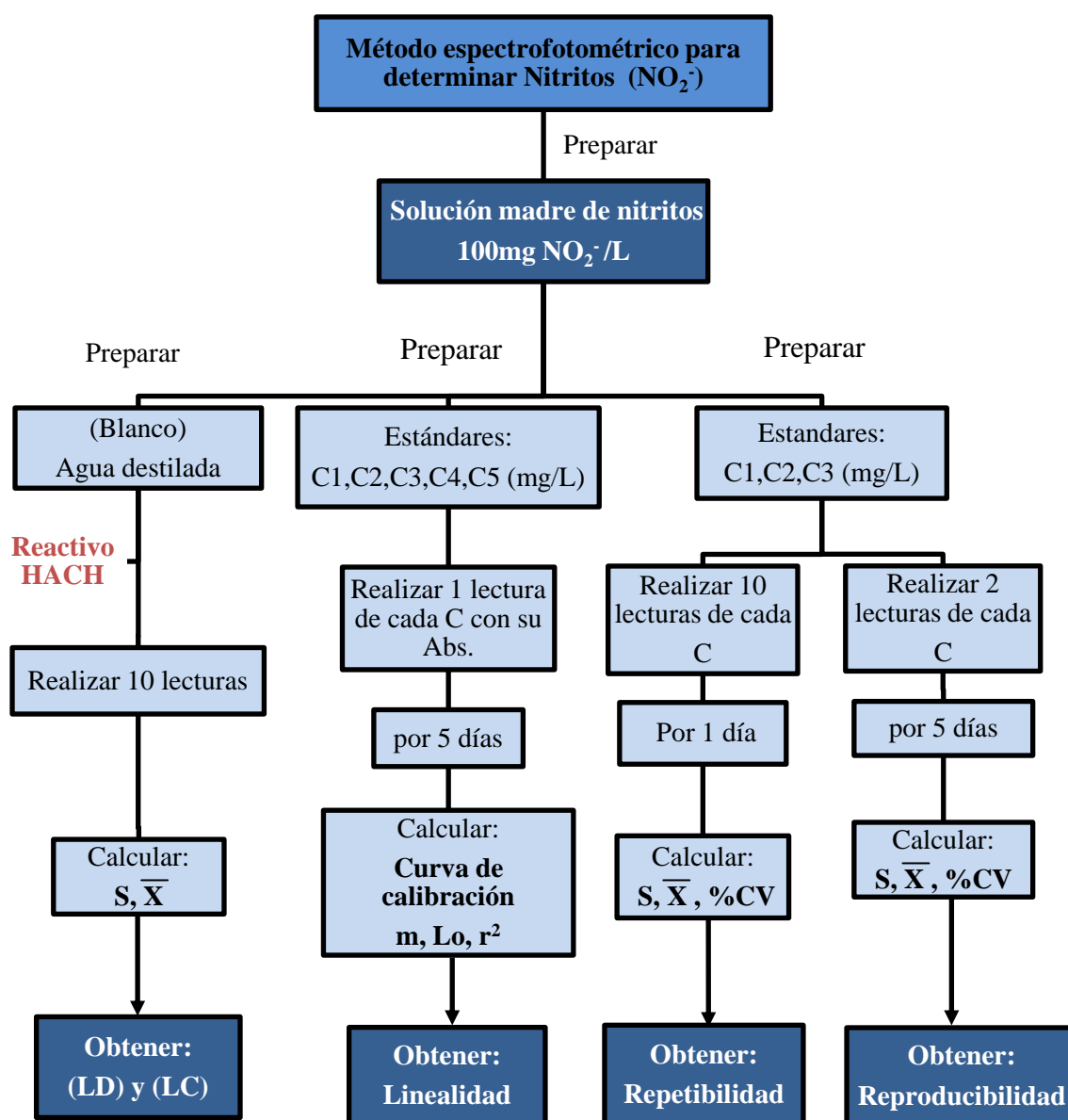
**Figura 3.1-1** Proceso de validación de boro



**Figura 3.1-2** Proceso de validación de fluoruros



**Figura 3.1-3** Proceso de validación de nitritos



### 3.3.1.1 Parámetros de validación.

En la validación de métodos para la determinación de boro, fluoruros y nitritos los parámetros que se utilizaron son los siguientes:

**Linealidad.** Para los métodos de determinación de boro y nitritos, se realizaron lecturas de Concentración y Absorbancia, con ello se obtuvo 5 curvas de calibración, las mismas que nos indicaron las ecuaciones de las rectas, pendientes ( $m$ ), intersecciones con el eje y ( $b$ ) y coeficientes de determinación ( $r^2$ ).



Con los resultados obtenidos se realizó un análisis global, del cual se estableció el comportamiento lineal de la recta y se tomó como criterio de aceptabilidad al coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

**Límites.** Para los métodos de determinación de boro, fluoruros y nitritos, se realizaron 10 lecturas de blancos o estándares preparados en cada caso con sus respectivos reactivos como se indica más adelante de los cuales se obtuvo el límite de detección y límite de cuantificación.

**Exactitud.**

- **Veracidad:** Se obtuvo la recuperación.

**Recuperación:** El rango de aceptabilidad se obtuvo mediante el rango establecido por el Material de Referencia Certificado que se encuentra en el laboratorio OSP y es utilizado para las validaciones.

- **Precisión:** Se estableció en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

**Repetibilidad:** Se registró 10 mediciones de 3 diferentes concentraciones bajo las mismas condiciones en un solo día del que se calculó media ( $\bar{X}$ ), desviación estándar ( $S_r$ ), varianza ( $S_r^2$ ) y Porcentaje del coeficiente de variación (CVr%).

Se utilizó la prueba estadística que sigue distribución F de Fisher para lo cual se realizó un análisis de varianza, como se muestra en la tabla 5 a tres niveles de concentraciones para cada analito en un día de análisis con una repetición en cada nivel de concentración. Se realizó 30 mediciones diarias para cada analito dando un total de 90 datos.

**Tabla 3.1-1** Diseño experimental en condiciones de Repetibilidad

Tiempo	Día 1								
Analito	BORO			FLUORUROS			NITRITOS		
N° de Lecturas	1,0 mg/L	5,0 mg/L	10,0 mg/L	0,70 mg/L	1,50 mg/L	2,00 mg/L	0,020 mg/L	0,120 mg/L	0,300 mg/L
	Repeticiones			Repeticiones			Repeticiones		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Total</b>	10	10	10	10	10	10	10	10	10

**Reproducibilidad:** Se registró 10 mediciones de 3 diferentes concentraciones bajo las mismas condiciones en diferentes días en el que se obtuvo media ( $\bar{X}$ ), desviación estándar (SR), varianza ( $SR^2$ ) y Porcentaje del coeficiente de variación (CVR%).

Se utilizó además la prueba estadística que sigue la distribución F de Fisher para lo cual se realizó un análisis de varianza, esto se detalla en la tabla 6 donde se muestra tres niveles de concentraciones para cada analito en 5 días diferentes de análisis con dos repetición para cada día en los diferentes niveles de concentración, se obtuvo 30 mediciones por analito y un total de 90 datos.

**Tabla 3.1-2** Diseño experimental en condiciones de Reproducibilidad

Analito	BORO C mg/L			FLUORUROS C mg/L			NITRITOS C mg/L		
Día	1,0	5,0	10,0	0,70	1,50	2,00	0,020	0,120	0,300
	Repeticiones			Repeticiones			Repeticiones		
1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4	2	2	2	2	2	2	2	2	2
5	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>Total</b>	10	10	10	10	10	10	10	10	10

### 3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó como referencia los métodos del APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater 21 Edition 2005, así como las técnicas del Spectrophotometer Handbook HACH y MERCK.

*Métodos para la determinación de Boro mediante espectrofotometría de luz visible:*

- Método 4500-B C. Carmínico (Standard Methods APHA).
- Método 8015 Carmine Method Powder Pillows (Handbook HACH DR2800)

*Métodos para la determinación de Fluoruros mediante fotometría de luz visible.*

- Método 4500-F E. Complexona (Standard Methods APHA).
- Método 340.3 EPA
- Método 1.14557.000. Test en cubetas Fluoruros F<sup>-</sup> (Spectroquant; Procedimientos Merck)

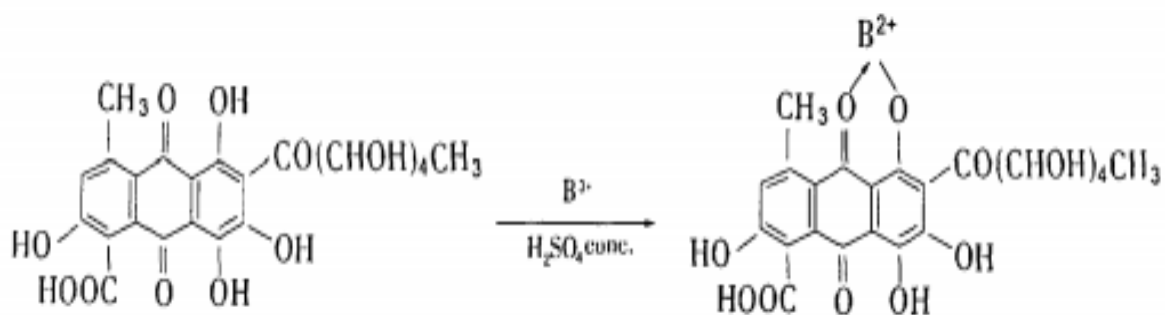
*Métodos para la determinación de Nitritos mediante espectrofotometría de luz visible.*

- Método 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> B. Colorimétrico (Standard Methods APHA).
- Método 8507 Diazotization Method Powder Pillows or AccuVac® Ampuls (Handbook HACH DR2800)

### 3.4.1 Método espectrofotométrico para la determinación de boro

**Discusión general.** En presencia de boro, una solución de carmín o ácido carmínico en ácido sulfúrico concentrado vira de rojo brillante a un rojo azulado o azul, dependiendo de la concentración de boro presente.

**Figura 3.1-4** Reacción del ácido carmínico en ácido sulfúrico en presencia de boro (Soto, 2000)



**Interferencias.** Los iones encontrados comúnmente en el agua limpia y aguas residuales, no interfieren en la medición.

#### Equipos y Materiales:

- Espectrofotómetro HACH DR2800 para uso a 605nm con cubetas de 25ml

**Fotografía 3.** Espectrofotómetro HACH DR 2800



- Balanza analítica

**Fotografía 4.** Balanza analítica



- Balón aforado 1000ml
- Balones aforados de 100ml.
- Balón aforado de 50ml
- Bureta de 50ml
- Probeta de 50ml
- Pipeta volumétrica de 2ml
- Erlenmeyer de 1000ml
- Tubos con tapa rosca
- Cubeta de vidrio 25ml

**Reactivos:**

- Ácido Bórico anhidro ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )
- Agua destilada
- Ácido Sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )<sub>c</sub>
- Reactivo para Boro sobres en polvo BoroVer ® 3
- *Patrón de referencia o material de referencia:*
  - ✓ ACIDO BORICO
  - ✓ PEI-245 BORO
  - ✓ QCI-245 BORO

Consérvense todos los reactivos en envases de polietileno o exentos de boro

## Procedimiento

- **Preparar solución madre de boro (100mg/L):** Disuélvanse 571,9983mg de ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) en agua destilada y diluir a 1000 ml; 1,00ml=1.00 ug de B. Dado que el ácido bórico pierde peso al secarlo a 105°C manténgase en frasco bien cerrado para evitar que penetre la humedad atmosférica y utilícese un reactivo que cumpla las especificaciones ACS (American Chemical Society) única organización en el mundo que establece los requerimientos y desarrolla los métodos validados, para la determinación de la pureza de los reactivos químicos.
- **Preparar solución reactivo para boro:** En un erlenmeyer colocar por 75ml de ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )<sub>c</sub> un sobre del reactivo en polvo BoroVer ® 3 HACH. Agitar y esperar que se disuelva. Este preparado sirve para dos muestras. Solución estable máximo 48h si se conserva en recipientes de plástico, no lo guarde en vidrio borosilicato (Pyrex ® o Kimax) por más de una hora, la solución de boro puede lixiviar de estos contenedores.

La solución Boro Ver 3/ ácido sulfúrico es muy ácido. Neutralizar a un pH de 6-9.

Consulte la MSDS actual para el manejo seguro y las instrucciones de eliminación.

- **Preparar estándar para obtener Límite de cuantificación y Límite de detección:**
  - ✓ Preparar una dilución de 50mg B<sup>-</sup>/L, tomando una alícuota de 25ml de la solución madre y aforando a 50ml con agua destilada.

### Cálculo:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Para C= 50mg/L

$$100\text{mg/L} \cdot V1 = 50\text{mg/L} \cdot 50\text{ml}$$

$$V1 = 25 \text{ ml}$$

- ✓ Preparar una solución estándar de 0,5 mg B<sup>-</sup>/L tomando una alícuota de 1ml de la dilución y aforando a 100ml con agua destilada.

### Cálculo:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Para C= 0,5 mg/L

$$50\text{mg/L} \cdot V1 = 0,5\text{mg/L} \cdot 100\text{ml}$$

$$V1 = 1 \text{ ml}$$

- **Preparar estándares.-**

- ✓ Preparar soluciones de concentraciones: 1,5,10,12,14 mg B<sup>-</sup>/L a partir de la solución madre de boro de la siguiente manera:

**Ejemplo:**

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Para C= 1mg/L

$$100\text{mg/L} \cdot V1 = 1\text{mg/L} \cdot 100\text{ml}$$

$$V1 = 1 \text{ ml}$$

**Tabla 3.1-3** Preparación de estándares de boro

Concentración (mg/L)	V (ml) tomados a partir de la solución madre de boro	Aforo (ml)
1	1	100
5	5	100
10	10	100
12	12	100
14	14	100

- Encender el espectrofotómetro DR2800 de HACH junto con el adaptador de cubetas en el compartimiento de cubetas para proteger el lente de la luz.
- Ir a la opción métodos seleccionados de la pantalla principal, luego escoger el método que corresponde a boro, el equipo está listo para empezar a trabajar.
- Colocar 2ml de la muestra en tubos de vidrio con tapa de rosca, enseguida colocar 35ml del reactivo de boro antes preparado en cada tubo. Tapar, agitar y esperar que el reactivo actúe por 25 min, una vez transcurrido el tiempo, colocar 25ml en las celdas de vidrio del espectrofotómetro de HACH, agitar, y proceder a la lectura. Se debe dar el mismo tratamiento al agua destilada (blanco) que servirá para ajustar el cero.
- Los datos de la pendiente, b y r<sup>2</sup> calculados en Excel ingresar en el registro cartas de control de tendencias para poder aceptar o rechazar la curva.

### 3.4.2 Método espectrofotométrico para la determinación de fluoruros

**Discusión general.** Dado que el método está sometido a errores debido a iones interferentes puede ser necesario destilar la muestra antes de hacer la determinación. Cuando los iones interferentes no excedan la tolerancia del método, la determinación de fluoruros se puede hacer directamente sin destilación.

En solución débilmente ácida amortiguada los iones fluoruros forman con alizarincomplexona y lantano (III) un complejo azul que se determina fotométricamente.

### Equipos y Materiales

- Fotómetro SQ118 (MERCK).
- Balanza analítica
- Pipeta automática de 10-100ul y de 0,5-2 ml
- Balón aforado 1000ml
- Balones aforados de 100ml.
- Bureta de 50ml
- Cubeta de 10ml tapa rosca y cubeta con blanco.
- Cubeta con blanco

### Reactivos

- Fluoruro de Potasio anhidro (KF)
- Agua destilada
- Reactivo F-1K
- TEST FLUORUROS: Cubetas con reacción para muestras y cubeta con blanco.
- *Patrón de referencia o material de referencia:*
  - ✓ Fluoruro de potasio
  - ✓ PEI-3051

### Procedimiento

- ***Preparar solución madre de fluoruros (100mg/L):*** Pesar 305,801mg de fluoruro de potasio (KF) anhidro y disolver en 1000ml.
- ***Preparar estándares:***  
Preparar soluciones de concentraciones: 0,10, 0,70, 1,00, 1,50 y 2,00 mg F/L a partir de la solución madre de fluoruros de la siguiente manera:

#### **Ejemplo:**

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Para C= 0,10 mg/L

$$100\text{mg/L} \cdot V1 = 0,10 \text{ mg/L} \cdot 100\text{ml}$$

$$V1 = 0,1 \text{ ml}$$



**Tabla 3.1-4** Preparación de estándares de fluoruros

Concentración (mg/L)	V (ml) tomados a partir de la solución madre de fluoruros	Aforo (ml)
0,10	0,1	100
0,70	0,7	100
1,00	1,0	100
1,50	1,5	100
2,00	2,0	100

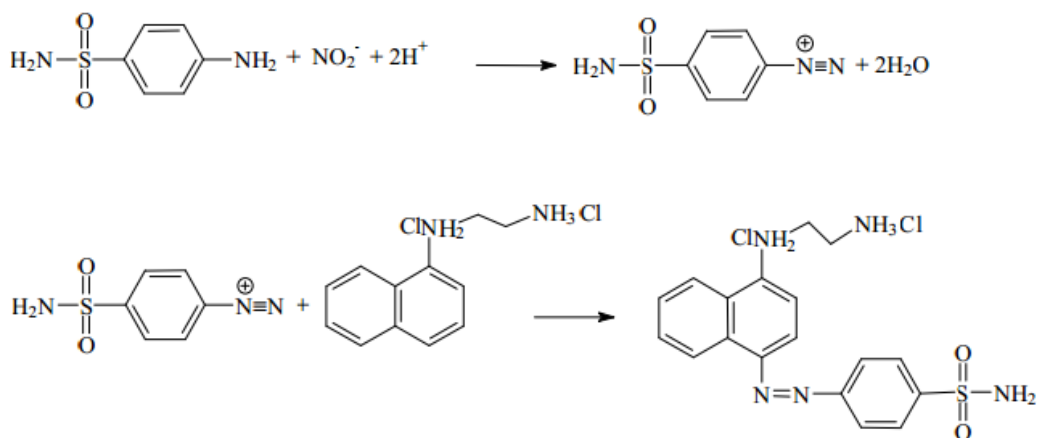
- Encender el fotómetro SQ118 de MERCK y colocar el número 116 para el método de fluoruros, el equipo está listo para empezar a trabajar.
- Colocar 5ml de cada estándar en tubos con el reactivo para fluoruros, luego colocar una dosis del reactivo F-1K, agitar y esperar 5 minutos hasta que reaccione el reactivo y proceder a las lecturas utilizando el blanco que viene incorporado en el Test.

### 3.4.3 Método espectrofotométrico para la determinación de nitritos

Este método es aplicable para aguas naturales y aguas residuales.

**Discusión general.** El nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) es un estado intermedio de la oxidación de nitrógeno, se determina por la formación de un colorante azo púrpura rojizo, producido a pH 2,0 a 2,5 por acoplamiento de sulfanilamidadiazotizada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (diclorhidrato de NED) como se indica en la figura 12.

**Figura 3.1-5** Reacción de la determinación de nitrito por el colorante azo púrpura



Colorante púrpura rojizo

El sistema de color obedece la ley de Beer hasta 180 g N/L con 1cm de recorrido de luz a 507nm.

### Equipos y Materiales:

- Espectrofotómetro de HACH DR2800 para uso a 507nm con cubetas de 25ml
- Balanza analítica
- Balones aforado 1000ml
- Balón aforado de 500ml
- Balón aforado de 250ml
- Balones aforados de 100ml.
- Bureta de 50ml
- Probeta de 50ml
- Cubeta de vidrio 25ml

### Reactivos:

- Nitrito de Sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) nuevo o reciente abierto, bien cerrado.
- Reactivo HACH para nitritos sobres en polvo Nitriver LR

**Fotografía 5:** Reactivo  
HACH



- *Agua exenta de nitritos:* Se utilizó gua redestilada o destilada, desionizada de la máxima pureza para preparar todas las soluciones y diluciones.
- *Patrón de referencia o material de referencia:*
  - ✓ Nitrito de sodio
  - ✓ QCI-028-3

### Procedimiento

- **Preparar solución madre de nitritos (100mg/L):** Se utilizó un nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) nuevo, para preparar la solución madre manteniendo los frascos bien tapados para evitar la entrada de aire cuando no se usen, con una calidad del reactivo inferior al 99 por 100. Dado que el  $\text{NO}_2^-$  se

oxida fácilmente en presencia de humedad. Disuélvanse 0.49264 g de  $\text{NaNO}_2$  en agua y dilúyase a 1000ml: 1,00ml=250 $\mu\text{g}$ . Consérvese con 1 ml de  $\text{CHCl}_3/\text{L}$  Esta solución no es estable, prepárese diario.

- **Preparar blanco para obtener Límite de cuantificación y Límite de detección:**

- ✓ La solución utilizada para las lecturas del blanco es únicamente agua exenta de nitritos (agua destilada).

- **Preparar estándares.-**

- ✓ Preparar una dilución de 1mg  $\text{NO}_2^-/\text{L}$ , tomando una alícuota de 10ml de la solución madre y aforando a 1000 ml con agua exenta de nitritos.

**Cálculo:**

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Para C= 1 mg/L

$$100\text{mg/L} \cdot V1 = 1\text{mg/L} \cdot 1000 \text{ ml}$$

$$V1 = 10 \text{ ml}$$

- ✓ Preparar soluciones de concentraciones: 0,020, 0,060, 0,120, 0,240 y 0,300 mg  $\text{NO}_2^-/\text{L}$  a partir de la dilución de nitritos de la siguiente manera:

**Ejemplo:**

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

Para C= 0,020 mg/L

$$1\text{mg/L} \cdot V1 = 0,020\text{mg/L} \cdot 500 \text{ ml}$$

$$V1 = 10 \text{ ml}$$

**Tabla 3.1-5 Preparación de Estándares de nitritos**

C (mg/L) $\text{NO}_2^-$	V (ml) tomados a partir de dilución de nitritos	Aforo (ml) con agua exenta de $\text{NO}_2^-$
0,020	10	500
0,060	15	250
0,120	12	100
0,240	24	100
0,300	30	100

- Encender el espectrofotómetro DR2800 de HACH junto con el adaptador de cubetas en el compartimiento de cubetas para proteger el lente de la luz.
- Ir a la opción métodos seleccionados de la pantalla principal, luego escoger el método que corresponde a nitritos, el equipo está listo para empezar a trabajar.
- Colocar 25ml de cada muestra en las celdas de vidrio del espectrofotómetro de HACH, colocar el contenido de un sobre del reactivo HACH en polvo para nitritos, agitar hasta que se disuelva, esperar 20 minutos y proceder a la lectura. Se debe dar el mismo tratamiento al agua destilada (blanco) que nos servirá para ajustar el cero.
- Los datos de la pendiente, b y  $r^2$  calculados en Excel ingresar en el registro cartas de control de tendencias para poder aceptar o rechazar la curva.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

##### 4.1.1 Análisis de resultados del Boro

##### 4.1.1.1 Límites para la determinación de boro.

**Tabla 4-1.** Análisis del LD y  
LC de boro

Nº Lecturas	Boro (B') mg/L
1	0,4
2	0,5
3	0,5
4	0,5
5	0,4
6	0,5
7	0,5
8	0,5
9	0,5
10	0,4
$\bar{X}$	0,5
S	0,0
LD	0,1
LC	0,5

**Nota:** Se muestra los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) que se obtuvieron utilizando las ecuaciones 1 y 2 de la pág. 10

- El LD obtenido indica el nivel mínimo de boro que puede detectarse confiablemente para los diferentes análisis.

- Los datos obtenidos del LC estableció el límite mínimo del boro, que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables, útil en la determinación del intervalo de trabajo.

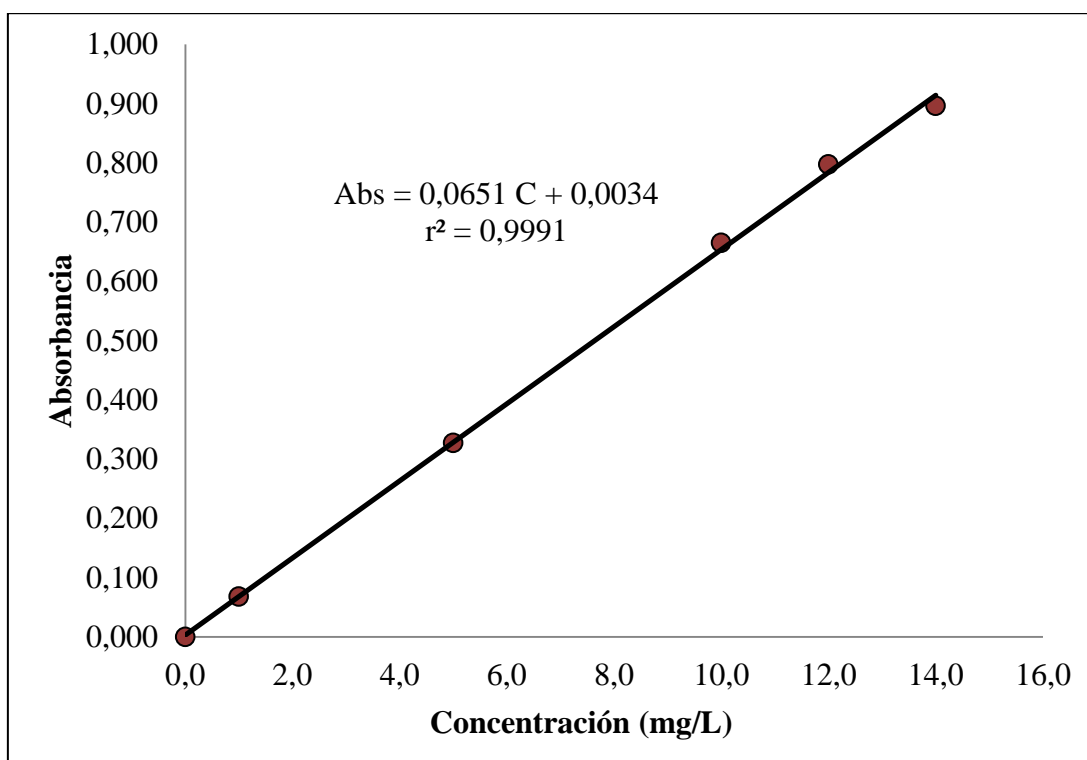
#### 4.1.1.2 Linealidad para la determinación de boro.

**Tabla 4-2.** Datos experimentales de Absorbancias de boro

Nº Lecturas	C B <sup>-</sup> mg/L	Abs Día 1	Abs Día 2	Abs Día 3	Abs Día 4	Abs Día 5
1	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	1	0,068	0,061	0,066	0,053	0,073
3	5	0,327	0,310	0,311	0,306	0,329
4	10	0,665	0,631	0,615	0,600	0,622
5	12	0,797	0,751	0,733	0,735	0,761
6	14	0,896	0,824	0,849	0,896	0,878

**Nota:** Se muestra las absorbancias obtenidas a cada nivel de concentración, preparadas a partir de una solución madre de boro, los mismos que se utilizaron para realizar los gráficos de las curvas de calibración individual para boro.

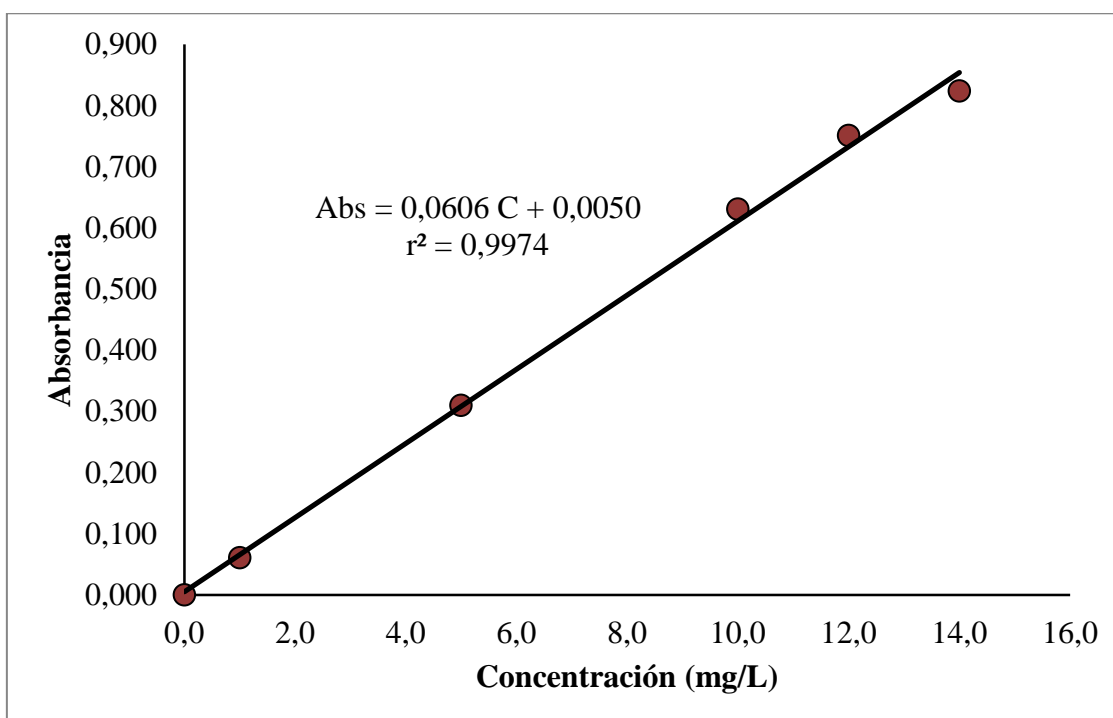
**Gráfica 4-1.** Curva de calibración de boro día 1



**Tabla 4-3.** Análisis de la curva de calibración  
del boro día 1

<b>m (L/mg)</b>	0,0651	<b>Lo</b>	0,0034
<b>Sm</b>	0,00078	<b>S Lo</b>	0,00598
<b>S y,x</b>	0,01028		
<b>r</b>	<b>0,9996</b>		
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9991		

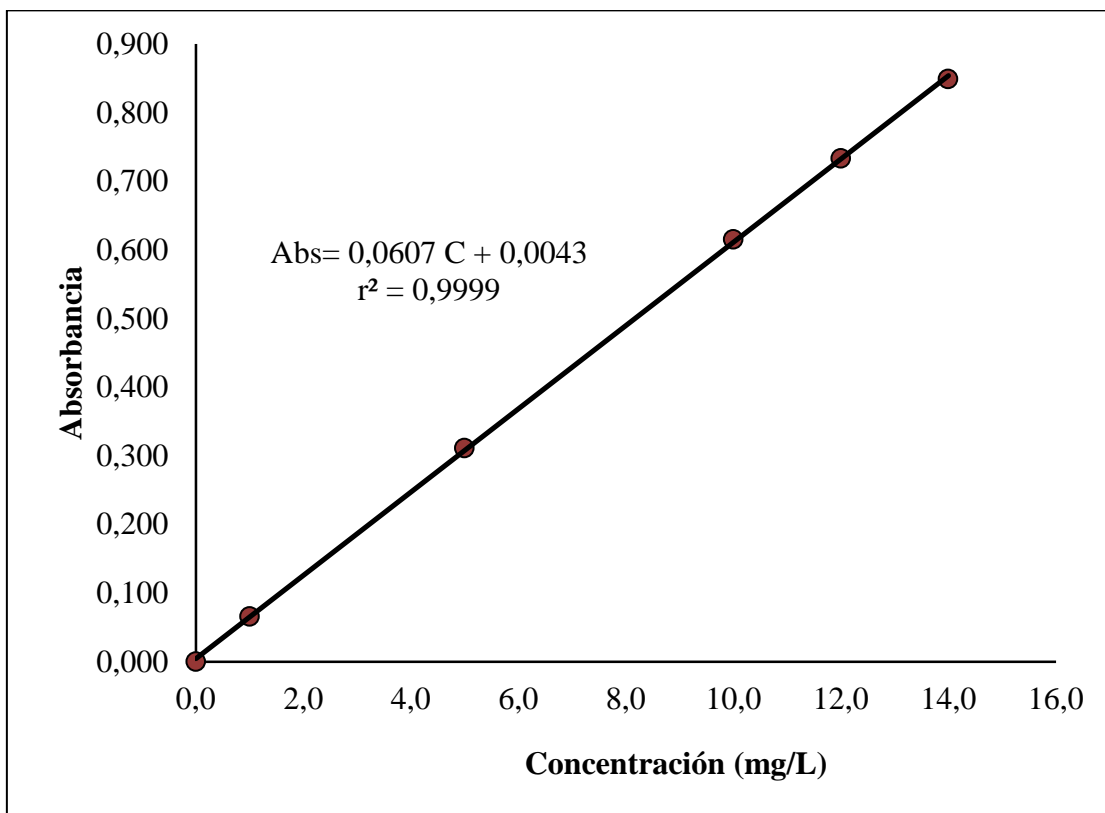
**Gráfica 4-2.** Curva de calibración de boro día 2



**Tabla 4-4.** Análisis de la curva de  
calibración del boro día 2

<b>m (L/mg)</b>	0,0606	<b>Lo</b>	0,0050
<b>Sm</b>	0,00314	<b>S Lo</b>	0,02398
<b>S y,x</b>	0,04121		
<b>r</b>	<b>0,9987</b>		
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9974		

**Gráfica 4-3.** Curva de calibración de boro día 3

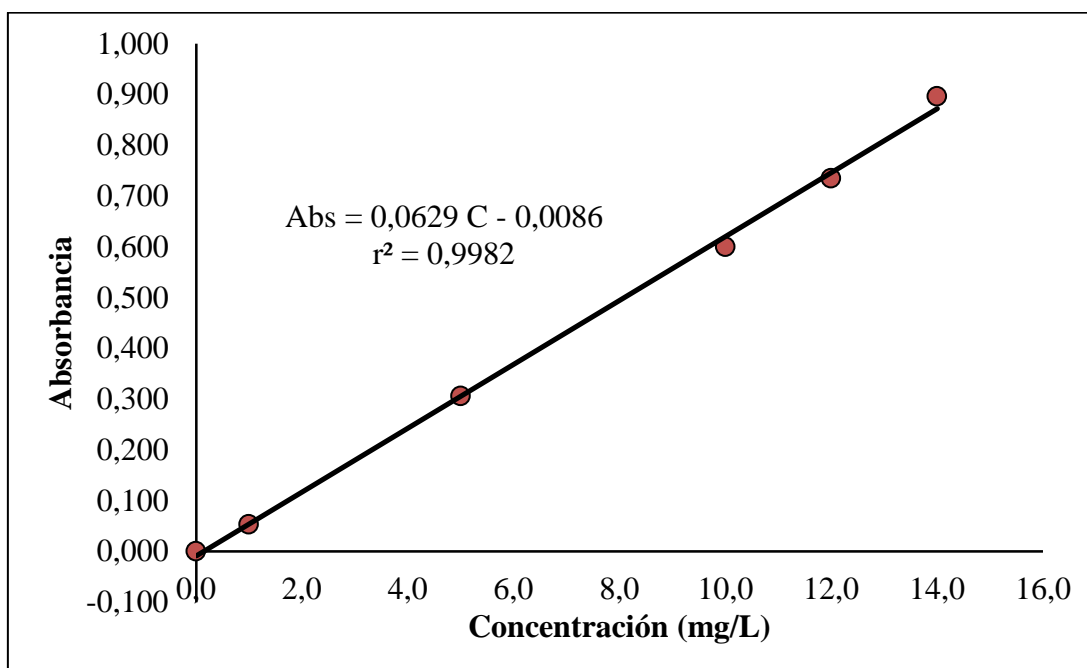


**Tabla 4-5.** Análisis de la curva de calibración  
del boro día 3

<b>m (L/mg)</b>	0,0607	<b>Lo</b>	0,0043
<b>S m</b>	0,00291	<b>S Lo</b>	0,02219
<b>S y,x</b>	0,03813		
<b>r</b>	<b>0,9999</b>		
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9999		



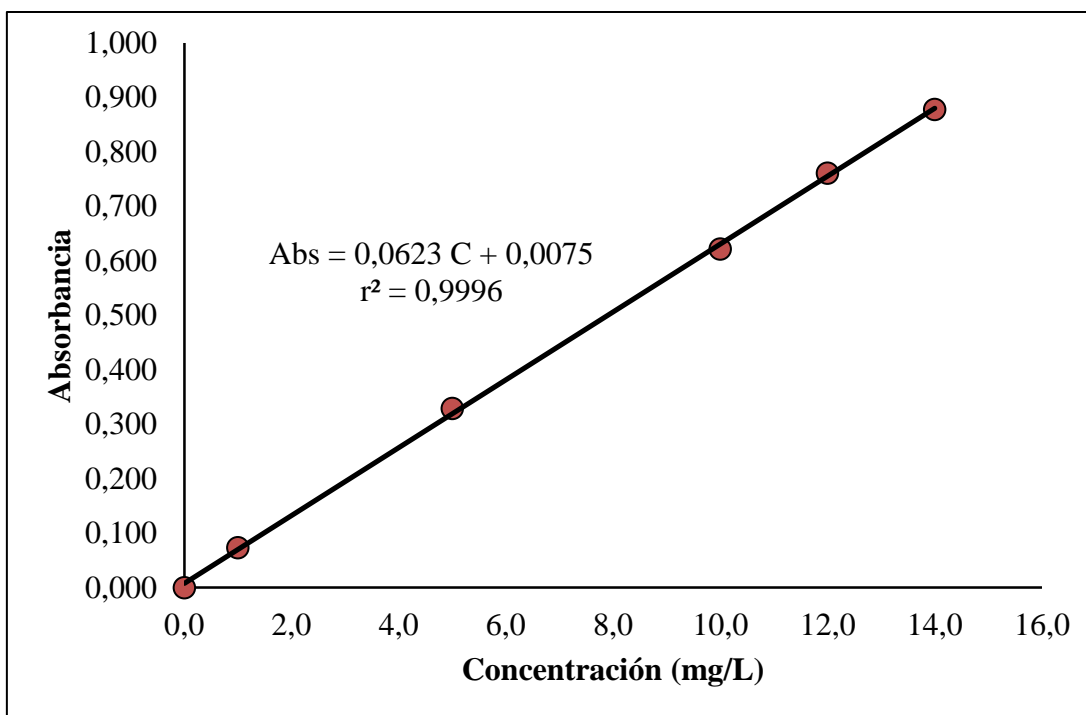
**Gráfica 4-4.** Curva de calibración de boro día 4



**Tabla 4-6.** Análisis de la curva de calibración  
del boro día 4

<b>m (L/mg)</b>	0,0629	<b>Lo</b>	-0,0086
<b>S m</b>	0,00250	<b>S Lo</b>	0,01905
<b>S y,x</b>	0,03274		
<b>r</b>	<b>0,9991</b>		
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9982		

**Gráfica 4-5.** Curva de calibración de boro día 5



**Tabla 4-7.** Análisis de la curva de calibración del boro día 5

<b>m (L/mg)</b>	0,0623	<b>Lo</b>	0,0075
<b>S m</b>	0,00168	<b>S Lo</b>	0,01280
<b>S x,y</b>	0,02200		
<b>r</b>	<b>0,9998</b>		
<b>r²</b>	0,9996		

- En los gráficos 1,2,3,4,5 se muestra las curvas de calibración individuales de boro, con las respectivas ecuaciones lineales (ec. 4, pág.12 ) y el coeficiente de determinación  $r^2$  que en cada curva  $r^2 > 0,99$  (ec. 5, pág.13), este valor demuestra la linealidad del método y la correlación entre la concentración y absorbancia.
- En las tablas 3,4,5,6,7 del capítulo se observa los cálculos para cada curva de calibración en 5 días diferentes, en donde nos muestra las pendientes (m), la ordenada al origen (lo) con sus respectivas desviaciones estándares (S) de acuerdo a las ecuaciones 7,8 de la pág. 13. Además se encuentra el error típico  $S_{xy}$  (ec. 6 pág 13) de las curvas de calibración de cada día que

representa la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado.

**Tabla 4-8.** Análisis global de las curvas de calibración de boro

Nº Días	Pendiente (m)	Intercepto (Lo)	Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )
1	0,0651	0,0034	0,9991
2	0,0606	0,0050	0,9974
3	0,0607	0,0043	0,9999
4	0,0629	-0,0086	0,9982
5	0,0623	0,0075	0,9996
$\bar{X}$	0,0623	0,0011	0,9987
$S$	0,0018	0,0063	0,0010
$t_{calculado}$			55,434
$t_{tablas}$			2,776

**Nota:** Se muestra los valores de la pendiente (m) que representa la sensibilidad del método, mayor pendiente mayor sensibilidad, útil a la hora de efectuar futuras calibraciones, por otro lado el término independiente e intersección con el eje y (lo) está relacionado con el error sistemático del método.

- Con la ec. 9 de la pág.14 se calculó el t-student dos colas en donde  $t_{calculado} > t_{tablas}$ , por lo que se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ , siendo la correlación significativa con la probabilidad calculada.

#### 4.1.1.3 Exactitud para la determinación de boro.

La exactitud se determinó a través de la veracidad y precisión:

**Precisión.**

- *Repetibilidad*

**Tabla 4-9.** Análisis de repetibilidad de boro

Tiempo	Día 1		
Analito	BORO		
N° de Lecturas	1 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
1	1,0	5,4	10,0
2	1,0	5,3	9,9
3	0,8	5,1	10,6
4	1,0	5,1	10,0
5	1,0	5,0	10,1
6	1,0	5,0	10,3
7	0,9	5,0	9,6
8	0,9	4,8	9,4
9	1,0	4,9	9,9
10	1,0	5,1	10,1
$\bar{X}$	1,0	5,1	10,0
S	0,0699	0,1767	0,3348
S <sup>2</sup>	0,004889	0,0312222	0,1121
%CV	7,3	3,5	3,35

**Tabla 4-10.** Análisis de varianza de boro para repetibilidad

C mg/L	$\bar{X}$	S	S <sup>2</sup>	F <sub>CALCULADA</sub>	F <sub>TABULADA</sub>
1	1,0	0,0699	0,004889	6,39	3,18
5	5,1	0,1767	0,0312222	3,59	3,18
10	10,0	0,3348	0,1121	22,93	3,18
Lr	0,2				
Lr	0,9				

**Nota:** Se muestra los valores obtenidos de repetibilidad junto con las desviaciones estándares (S) y las varianzas (S<sup>2</sup>) por el método de mínimos cuadrados, en cada concentración.

Se obtuvo:

- ✓ El estadístico F utilizando la ec. 17 de la pág. 18, en la que se observa que para cada nivel de concentración  $F_{calc}$  es mayor a  $F_{tab}$ , existe diferencia significativa entre las medidas de cada concentración, existe repetibilidad en cada caso y con ello precisión y exactitud.
- ✓ Además de un rango de repetibilidad como criterio de aceptación.

- *Reproducibilidad*

**Tabla 4-11.** Análisis de reproducibilidad de boro

Día	Analito	BORO		
	Nº de Lecturas	1,0 mg/L	5,0 mg/L	10,0 mg/L
1	1	0,9	5,0	10,0
	2	1,0	4,9	10,1
2	3	1,1	5,1	10,1
	4	0,9	5,1	9,7
3	5	1,0	5,4	10,6
	6	1,1	5,0	9,7
4	7	1,0	4,7	9,9
	8	1,0	4,8	9,3
5	9	0,9	5,1	9,9
	10	1,1	4,8	9,8
$\bar{X}$		1,0	5,0	10,0
S		0,0816	0,2025	0,338
$S^2$		0,006667	0,041	0,114333
%CV		8,1650	4,0578	3,4120

**Tabla 4-12.** Análisis de varianza de boro para reproducibilidad

C mg/L	$\bar{X}$	S	S <sup>2</sup>	F <sub>CALCULADA</sub>	F <sub>TABULADA</sub>
1,0	1,0	0,0816	0,006667	6,15	3,18
5,0	5,0	0,2025	0,041	2,79	3,18
10,0	10,0	0,338	0,114333	17,15	3,18
LR	0,2				
LR	0,9				

**Nota:** Se muestra los valores obtenidos de reproducibilidad junto con las desviaciones estándares (S) y las varianzas (S<sup>2</sup>) en cada concentración.

Se obtuvo:

- ✓ El estadístico F, utilizando la ec. 17 de la pág. 18, en la que se observa que para el rango de concentración bajo y alto F<sub>calc</sub> es mayor la F<sub>tab</sub>, existe diferencia significativa entre las medidas de cada concentración, existe reproducibilidad en cada caso y con ello precisión y exactitud..
- ✓ Las desviaciones estándares de cada concentración son utilizados para el cálculo de incertidumbre combinada.
- ✓ Además del rango de reproducibilidad como criterio de aceptación.

#### **Veracidad.**

- *Recuperación:* MRC= 80-120%

La exactitud se determinó con el porcentaje de recuperación evaluando el Material de Referencia Certificado MRC para boro y comparando con su certificado de calidad o utilizando la ec.13 de la pág. 15

El boro tiene un rango de recuperación de 80-120% para cualquier muestra analizada en el equipo.

*Aptitud del laboratorio:*

**Tabla 4-13.** Análisis de desviación del laboratorio en la determinación de boro

Puntos	1	2
MRC	WP11-2-80	QC-3034-2
$\bar{X}$ certificada mg/L	0,989	1,670
Sp	0,0193	0,0984
Nº Lecturas	C mg/L	
1	1,0	1,5
2	0,9	1,7
3	1,0	1,4
$\bar{X}$ experimental	1,0	1,5
S	0,058	0,161
Z-score	-1,16	-1,56

**Nota:** Se muestra la aptitud del laboratorio mediante la prueba Z-score establecida en la ec. 18 de la p. 20 utilizando los respectivos MRC.

#### 4.1.1.4 Incertidumbre para la determinación de boro.

**Función respuesta.**

**Tabla 4-14.** Resolución del espectrofotómetro HACH DR2800

	ABSORBANCIA	%	% $\mu$ resolución
RESOLUCIÓN ESPECTROFOTÓMETRO	0,001	0,111	0,064

**Nota:** Se muestra la resolución en absorbancia del espectrofotómetro HACH DR 2800 de acuerdo a la calibración del equipo, expresado en porcentaje y utilizando ec. 19 de la pág. 21.

- Indica la incertidumbre que tendrá cada medición para el cálculo de la incertidumbre combinada de los estándares de boro (% $\mu$  nivel).

**Tabla 4-15.** Cálculo de la incertidumbre de las lecturas de los estándares de boro

Nº	VALOR NOMINAL C (mg/L)	LECTURA ABS.	VALOR EXPERIMENTAL C (mg/L)	RESIDUAL Vnom. - Vexp.	FALTA DE AJUSTE FA	% FA	S de C	µA C (mg/L)	µA %
1	1,0	0,068	1,0	0,000	0,100	10,00	0,057735	0,0333	3,333
2		0,061	0,9	0,100					
3		0,066	1,0	0,000					
4	5,0	0,307	5,0	0,000	0,200	4,00	0,100000	0,0577	1,155
5		0,310	4,9	0,100					
6		0,311	4,8	0,200					
7	10,0	0,655	10,0	0,000	0,500	5,00	0,264575	0,1528	1,528
8		0,631	9,6	0,400					
9		0,615	9,5	0,500					
10	12,0	0,797	11,6	0,400	0,600	5,00	0,115470	0,0667	0,556
11		0,751	11,4	0,600					
12		0,733	11,4	0,600					
13	14,0	0,896	13,7	0,300	1,000	7,14	0,378594	0,2186	1,561
14		0,824	13,6	0,400					
15		0,849	13,0	1,000					
					%FA (máx):	10,00			

**Nota:** En la tabla 24 se muestra las lecturas de absorbancia y concentración de los estándares preparados.



- Se aprecia las desviaciones estándares (S) para cada concentración las misma que junto a la aplicación de la ec. 19 de la pág. 21 se calculó las incertidumbres de los estándares  $\mu A$ , expresada en mg/L y en porcentaje y estas serán utilizadas para el cálculo de la incertidumbre combinada de cada nivel de concentración (% $\mu$  nivel).
- También se observa el porcentaje residual más elevado que se obtiene de la resta del valor nominal con el valor experimental, de los cuales se toma el máximo valor del residual para cada concentración obteniendo falta de ajuste expresándolo en porcentaje y con ello el % máximo de falta de ajuste (%FA máx.) que nos sirve para calcular la incertidumbre expandida de cada estándar.

**Tabla 4-16.** Incertidumbre de la solución madre de boro ( $\mu$ solución madre)

$$U \text{ Solución madre: } \sqrt{(\mu_{\text{balanza}})^2 + (\mu_{\text{resolución}})^2 + (\mu_a)/(va)^2}$$

		%
$\mu_{\text{balon1000ml}}$	0,4	0,0400
$\mu_{\text{balanza}}$		0,00005
$\mu_{\text{resolución}}$	0,0001	0,00003
$\mu_{\text{balon/2}}$		0,0200
$\mu_{\text{solución madre}}$		0,020

**Nota:** Se muestra el cálculo de la incertidumbre combinada que existe en la preparación de la solución madre de boro ( $\mu$ solución madre), calculada con las ecuaciones 20-21 de la página 22.

- Se utilizó las siguientes incertidumbres:
  - ✓ balanza ( $\mu_{\text{balanza}}$ ), obtenida de la resolución de la misma expresada en porcentaje.
  - ✓ incertidumbre estándar de la resolución ( $\mu_{\text{resolución}}$ ), utilizando la ec. 19 y expresado en porcentaje
  - ✓ balón de 1000ml ( $\mu_{\text{balón}}$ ), obtenida de la resolución del balón dividiéndola para 2.
- La  $\mu$ solución madre sirve para calcular la incertidumbre combinada de la preparación de estándares a cada nivel de concentración ( $\mu_{\text{patrón}}$ ).

**Tabla 4-17.** Cálculo de la incertidumbre en la preparación de estándares para cada nivel de concentración de boro ( $\mu$ patrón)

C (ppm)	1	5	10	12	14
$\mu FD = FD * \sqrt{(\mu vt)/(vt)^2 + (\mu a)/(va)^2}$					
FD	25	5	3	2	2
$\mu$ balon (100ml)	0,1				
	%				
$\mu vt = \mu$ balon(100ml)/100	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
$\mu a = \mu$ balon(100ml)/2	0,050				
$\mu$ FD	1,250	0,250	0,125	0,104	0,089
$\mu$ bureta (25ml)	0,100				
$\mu$ solución madre	0,020				
$\mu$ patrón	1,255	0,275	0,169	0,154	0,144

**Nota:** Se muestra el cálculo de la incertidumbre combinada que existe en la preparación de los estándares para cada nivel de concentración de boro ( $\mu$ patrón), calculada con la ec. 20 de la pág. 22.

- Se utilizó las incertidumbres:
  - ✓ solución madre ( $\mu$ solución madre), de la tabla 16 del capítulo,
  - ✓ bureta de 25ml ( $\mu$ bureta), obtenida con la resolución de la bureta expresada en unidad y porcentaje,
  - ✓ factor de dilución ( $\mu$ FD), utilizando la ec.20 de la pág.22 y el FD de cada concentración.
  - ✓ balón de 100ml ( $\mu$ balón), obtenida con la resolución del balón dividiéndola para dos.
- La  $\mu$ patrón sirve para calcular la incertidumbre de los estándares de boro ( $\mu$ nivel).

**Tabla 4-18.** Resumen del cálculo de la incertidumbre de los estándares de boro ( $\mu$ nivel)

C (ppm)	1	5	10	12	14
$\mu A$	3,333	1,155	1,528	0,556	1,561
$\mu$ resol	0,064				
$\mu$ patrón	1,255	0,275	0,169	0,154	0,144
% $\mu$ nivel	3,56	1,19	1,54	0,58	1,57

**Nota:** Se muestra la incertidumbre combinada de los estándares de boro ( $\mu$ nivel), utilizando la ec. 20.

- Se utilizó las siguientes incertidumbres:
  - ✓ incertidumbre de la preparación de los estándares para cada nivel de concentración de boro ( $\mu$ patrón), de la tabla 17 del capítulo.
  - ✓ incertidumbre del espectrofotómetro ( $\mu$ resol.), de la tabla 14 del capítulo.
  - ✓ incertidumbre de cada concentración ( $\mu$ A) de la tabla 15 del capítulo.
- Utilizada para el cálculo de la incertidumbre expandida.

**Tabla 4-19.** Incertidumbre expandida  
para boro (%UFR)

VALOR NOMINAL C (mg/L)	%U
1	17,12
5	12,38
10	13,08
12	11,16
14	13,14
<b>%UFR(k:2)</b>	17,12

**Nota:** Sse muestra la incertidumbre expandida de la función respuesta (%UFR) proporcionado a un alto nivel de confianza (95%) en la que se utilizó la ec. 23 pág 22  $k=2$ .

- La incertidumbre expandida está dada por el valor máximo de %U de cada valor nominal, los mismos que se calcularon con %F<sub>Amáx</sub> (tabla 15) +  $\mu$ nivel (tabla 18).
- El valor de %UFR (k:2) es la incertidumbre de la función respuesta dada por la calibración de los equipos y materiales utilizados en la medición.

### Evaluación de la Incertidumbre en diferentes rangos.

**Tabla 4-20.** Incertidumbre de los equipos utilizados en la medición de boro

EQUIPO	Calibración	$\mu\%$
U FR(calibración)		17,125
Pipeta (5ml)	0,0300	0,600
Resolución Espectrofotómetro (abs.)	0,001	0,111

**Nota:** Se indica la incertidumbre ( $\mu$ ) existente en los equipos utilizados en la determinación de boro.

- Entre los que se encuentra:
  - ✓ la incertidumbre de la función respuesta de la preparación de estándares de la tabla 19,
  - ✓ la incertidumbre de la pipeta de 5 ml que se obtuvo de la resolución de la pipeta expresada en unidad.
  - ✓ y la incertidumbre de la resolución del espectrofotómetro HACH DR2800, de la tabla 14.
- Tomando como base la calibración de los mismos y expresados en porcentaje.
- Rango bajo**

**Tabla 4-21.** Incertidumbre de reproducibilidad y exactitud del rango bajo de boro

	mg/L	Valor Nominal	%
S reproducibilidad	0,0816	1,0	8,16
S exactitud	0,0584	0,989	5,84

**Tabla 4-22.** Incertidumbre ( $\mu$ ) de rango bajo de boro

INCERTIDUMBRE ACUMULADA		13,20
INCERTIDUMBRE EXPANDIDA		26,39
	mg/L	U%
RANGO	0,5 ---- 1,0	26,4

- En la tabla 21 se indica la incertidumbre de la reproducibilidad y exactitud dada por las desviaciones estándares (S) de la tabla 11 y 13 (aptitud del laboratorio) respectivamente, a las

que se divide para el valor nominal declarado o MRC y se las expresa en porcentaje para el rango bajo en la determinación de boro.

- En la tabla 22 se muestra la incertidumbre ( $\mu$ ) acumulada dentro de la cual se tomó en cuenta las incertidumbres:

- ✓ de los equipos (tabla 20),
- ✓ de la reproducibilidad y exactitud (tabla 21)

Calculado con la ec. 20 y 21 de la pág. 22 y expresadas en porcentaje

Se obtiene la incertidumbre expandida utilizando la ec.23 de la pág. 22 junto con la incertidumbre acumulada dentro del rango bajo en la determinación de boro.

- **Rango Alto**

**Tabla 4-23.** Incertidumbre de reproducibilidad y exactitud del rango alto de boro

	mg/L	Valor Nominal	%
<b>S reproducibilidad</b>	0,338	10,0	3,38
<b>S exactitud</b>	0,161	1,670	9,62

**Tabla 4-24.** Incertidumbre ( $\mu$ ) de rango alto de boro

<b>INCERTIDUMBRE ACUMULADA</b>		13,32
<b>INCERTIDUMBRE EXPANDIDA</b>		26,64
	<b>mg/L</b>	<b>U%</b>
<b>RANGO</b>	1,0 --- 10,0	26,6

- En la tabla 23 se indica la incertidumbre de la reproducibilidad y exactitud dada por las desviaciones estándares (S) de la tabla 11 y 13 (aptitud del laboratorio) respectivamente, a las que se divide para el valor nominal declarado o MRC y se las expresa en porcentaje para el rango alto en la determinación de Boro.
- En la tabla 24 se muestra la incertidumbre ( $\mu$ ) acumulada dentro de la cual se tomó en cuenta las incertidumbres:
  - ✓ de los equipos (tabla 20),
  - ✓ de la reproducibilidad y exactitud (tabla 23)

Calculado con la ec. 20 y 21 de la pág. 22 y expresadas en porcentaje

Se obtiene la incertidumbre expandida utilizando la ec.23 de la pág. 22 junto con la incertidumbre acumulada dentro del rango alto en la determinación de boro.

**Tabla 4-25.** Resumen de resultados del boro y criterios de aceptación

FRECUENCIA	PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	VALOR OBTENIDO
1 vez a la Semana	DUPLICADO Repetibilidad Reproducibilidad	Lr LR	$\leq 0.2$ BAJO $\leq 0.9$ ALTO
1 vez al Año	Intercomparación	Z-score	$\leq 2$
1 vez al Mes	QC/Material de Referencia	% Recuperabilidad	80-120%
1 vez al Año	curvas de calibración	$r^2$	$> 0.99$
		Pendiente (m)	Entre (0.596-0.651)
		(b)	Entre (-0.0084-0.0105)

Incertidumbre del método	
RANGO	U % (factor K=2)
RANGO BAJO	26.4
RANGO ALTO	26.6

**Nota:** Se muestra el resumen de los parámetros con los respectivos criterios de aceptación.

- Se estableció el rango de incertidumbre ( $\mu$ ) del método.

#### 4.1.2 Análisis de resultados de Fluoruros

##### 4.1.2.1 Límites para la determinación de fluoruros.

**Tabla 4-26.** Análisis del LD y LC  
de fluoruros

Nº Lecturas	Fluoruros (F) mg/L
1	0,07
2	0,03
3	0,08
4	0,03
5	0,05
6	0,08
7	0,08
8	0,09
9	0,08
10	0,04
$\bar{X}$	0,06
S	0,02
LD	0,07
LC	0,23

**Nota:** Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) que se obtuvieron utilizando las ecuaciones 1 y 2 de la pág. 10.

- El LD obtenido indica el nivel mínimo de fluoruros que puede detectarse confiablemente para los diferentes análisis.
- Los datos obtenidos del LC estableció el límite mínimo del fluoruros que se puede cuantificar con exactitud y precisión aceptables, útil en la determinación del intervalo de trabajo.

#### 4.1.2.2 Exactitud para la determinación de fluoruros.

La exactitud se determinó a través de la veracidad y precisión:

##### **Precisión.**

- *Repetibilidad*

**Tabla 4-27.** Análisis de repetibilidad de fluoruros

<b>Tiempo</b>	<b>Día 1</b>		
<b>Analito</b>	<b>FLUORUROS</b>		
<b>Nº de Lecturas</b>	0,70 mg/L	1,50 mg/L	2,00 mg/L
1	0,70	1,52	1,95
2	0,72	1,50	1,95
3	0,75	1,43	1,86
4	0,74	1,49	1,87
5	0,69	1,43	1,93
6	0,72	1,55	1,85
7	0,73	1,45	1,86
8	0,71	1,57	1,94
9	0,71	1,45	1,96
10	0,64	1,53	2,05
$\bar{X}$	0,71	1,49	1,92
<b>S</b>	0,031	0,051	0,0595
<b>S<sup>2</sup></b>	0,00094	0,00255	0,00354
<b>%CV</b>	4,3198	3,3853	3,0939



**Tabla 4-28.** Análisis de varianza de fluoruros para repetibilidad

C mg/L	$\bar{X}$	S	$S^2$	F <sub>CALCULADA</sub>	F <sub>TABULADA</sub>
0,70	0,71	0,031	0,00094	2,71	3,18
1,50	1,49	0,051	0,00255	1,39	3,18
2,00	1,92	0,0595	0,00354	3,77	3,18
Lr	0,09				
Lr	0,16				

**Nota:** Se muestra los valores obtenidos de repetibilidad junto con las desviaciones estándares (S) y las varianzas ( $S^2$ ) utilizando el método de mínimos cuadrados.

Se obtuvo:

- ✓ El estadístico F utilizando la ec. 17 de la pág. 18, donde se observa que F<sub>calc</sub> es mayor a F<sub>tab</sub> en la concentración más alta de fluoruros, existe diferencia significativa entre las medidas de las concentraciones, existe repetibilidad para la concentración más alta y con ello precisión y exactitud.
- ✓ Además de un rango de repetibilidad como criterio de aceptación.

- *Reproducibilidad*

**Tabla 4-29.** Análisis de reproducibilidad de fluoruros

Día	Analito	FLUORUROS		
	Nº de Lecturas	0,70 mg/L	1,50 mg/L	2,00 mg/L
1	1	0,69	1,41	1,94
	2	0,67	1,45	1,97
2	3	0,60	1,40	1,87
	4	0,63	1,45	1,80
3	5	0,64	1,52	1,87
	6	0,59	1,55	1,86
4	7	0,66	1,45	1,75
	8	0,66	1,43	1,80
5	9	0,62	1,38	1,81
	10	0,64	1,44	1,77
$\bar{X}$		0,64	1,45	1,84
S		0,0313	0,0520	0,07
S <sup>2</sup>		0,00098	0,0027	0,0046
%CV		4,8858	3,5929	3,6797

**Tabla 4-30.** Análisis de varianza de fluoruros para reproducibilidad

C mg/L	$\bar{X}$	S	S <sup>2</sup>	F <sub>CALCULADA</sub>	F <sub>TABULADA</sub>
0,7	0,64	0,0313	0,00098	2,77	3,18
1,5	1,45	0,0520	0,0027	1,70	3,18
2,0	1,84	0,07	0,0046	4,71	3,18
LR	0,09				
LR	0,19				

**Notas:** Se muestra los valores obtenidos de reproducibilidad junto con las desviaciones estándares (S) y las varianzas (S<sup>2</sup>) utilizando el método de mínimos cuadrados en cada concentración.

Se obtuvo:

- ✓ El estadístico F utilizando la ec. 17 de la pág. 18, donde se observa que  $F_{calc}$  es mayor a  $F_{tab}$  en la concentración más alta de fluoruros, existe diferencia significativa entre las medidas de las concentraciones, existe reproducibilidad en cada caso y con ello precisión y exactitud.
- ✓ Las desviaciones estándares de cada concentración son utilizados para el cálculo de incertidumbre combinada en cada rango.
- ✓ Además de un rango de reproducibilidad como criterio de aceptación.

### Veracidad.

- *Recuperación:* La exactitud se determinó con el porcentaje de recuperación evaluando el Material de Referencia Certificado MRC para fluoruros utilizando las ecuaciones 13 y 14 de las páginas 15 y 16 respectivamente para obtener significancia estadística.
- *Aptitud del laboratorio:*

**Tabla 4-31.** Análisis de desviación del laboratorio en la determinación de fluoruros

Puntos	1	2
MRC	WP11-2-80	WS11-2-82
X declarado C mg/L	22,90	32,1
Sp	-	-
Nº Lecturas	C mg/L	
1	23,00	32,0
2	26,00	31,0
3	24,00	30,0
$\bar{X}$	24,33	31
S	1,5275	1,0000
Z-score	1	-1
% Recuperabilidad	106	97
t calculado	-2,268	1,732
t tablas	4,303	4,303

**Nota:** Se muestra la aptitud del laboratorio mediante la prueba Z-score establecida en la ec. 18 de la pág 20 y utilizando los respectivos MRC.

- También se calculó el % de recuperabilidad y se realizó la prueba t en donde para los dos casos  $t_{\text{calc.}} < t_{\text{tabl.}}$  no hay diferencia estadísticamente significativa, no es necesario ninguna corrección.

#### 4.1.2.3 Incertidumbre del método para la determinación de fluoruros.

##### Evaluación de la Incertidumbre.

**Tabla 4-32.** Incertidumbre de los equipos utilizados en la medición de fluoruros

EQUIPO	$\mu$	%
Resolución de equipos FOTÓMETRO	0,01	0,50

**Nota:** Se indica la incertidumbre ( $\mu$ ) existente en el fotómetro SQ 118 de MERCK utilizado en la determinación de fluoruros, tomando como base la calibración del equipo y expresado en porcentaje.

**Tabla 4-33.** Incertidumbre de reproducibilidad y exactitud de fluoruros

	$\mu$ (mg/l)	$\mu$ (%)
S reproducibilidad	0,07	3,39
S exactitud(MR)	1,00	4,37

Elaborado por: Yadira Solís

**Tabla 4-34.** Incertidumbre ( $\mu$ ) de fluoruros

INCERTIDUMBRE ACUMULADA		5,54
INCERTIDUMBRE EXPANDIDA		11,07
	mg/l	U (%)
RANGO	0,23---2,00	11,07

- En la tabla 33 se indica la incertidumbre de la reproducibilidad y exactitud dada por las desviaciones estándares (S) de la tabla 29 y 31 (aptitud del laboratorio) respectivamente, a las

que se divide para el valor nominal declarado o MRC y se las expresa en porcentaje en la determinación de fluoruros.

- En la tabla 34 se muestra la incertidumbre ( $\mu$ ) acumulada dentro de la cual se tomó en cuenta las incertidumbres:

- ✓ de los equipos (tabla 32),
- ✓ de la reproducibilidad y exactitud (tabla 33)

Calculado con la ec. 20 y 21 de la pág. 22 y expresadas en porcentaje

Se obtiene la incertidumbre expandida a partir de la ec.23 de la pág. 22 y de la incertidumbre acumulada dentro del rango alto en la determinación de boro.

**Tabla 4-35.** Resumen de resultados de fluoruros y criterios de aceptación

FRECUENCIA	PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	VALOR OBTENIDO
1 vez a la Semana	DUPLICADO Repetibilidad Reproducibilidad	Lr LR	$\leq 0.09$ $\leq 0.16$
1 vez al Año	Intercomparación	Z-score	$\leq 2$
1 vez al Mes	QC/Material de Referencia	% Recuperabilidad	80-120%

<b>Incertidumbre del método</b>
<b>U % (factor K=2)</b>
11.07

**Nota:** Se muestra el resumen de los parámetros con los respectivos criterios de aceptación.

- Se estableció la incertidumbre ( $\mu$ ) del método.

### 4.1.3 Análisis de resultados de Nitritos

#### 4.1.3.1 Límites para la determinación de nitritos.

**Tabla 4-36.** Análisis del LD y  
LC de nitritos

Nº Lecturas	Nitritos NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> mg/L
1	0,005
2	0,004
3	0,004
4	0,004
5	0,007
6	0,004
7	0,004
8	0,004
9	0,004
10	0,004
$\bar{X}$	0,004
S	0,001
LD	0,003
LC	0,010

**Nota:** Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) que se obtuvieron utilizando las ecuaciones 1 y 2 de la pág. 10.

- El LD obtenido indica el nivel mínimo de nitritos que puede detectarse confiablemente para los diferentes análisis.
- Los datos obtenidos del LC estableció el límite mínimo de nitritos, que se puede determinar con exactitud y precisión aceptables, útil en la determinación del intervalo de trabajo.

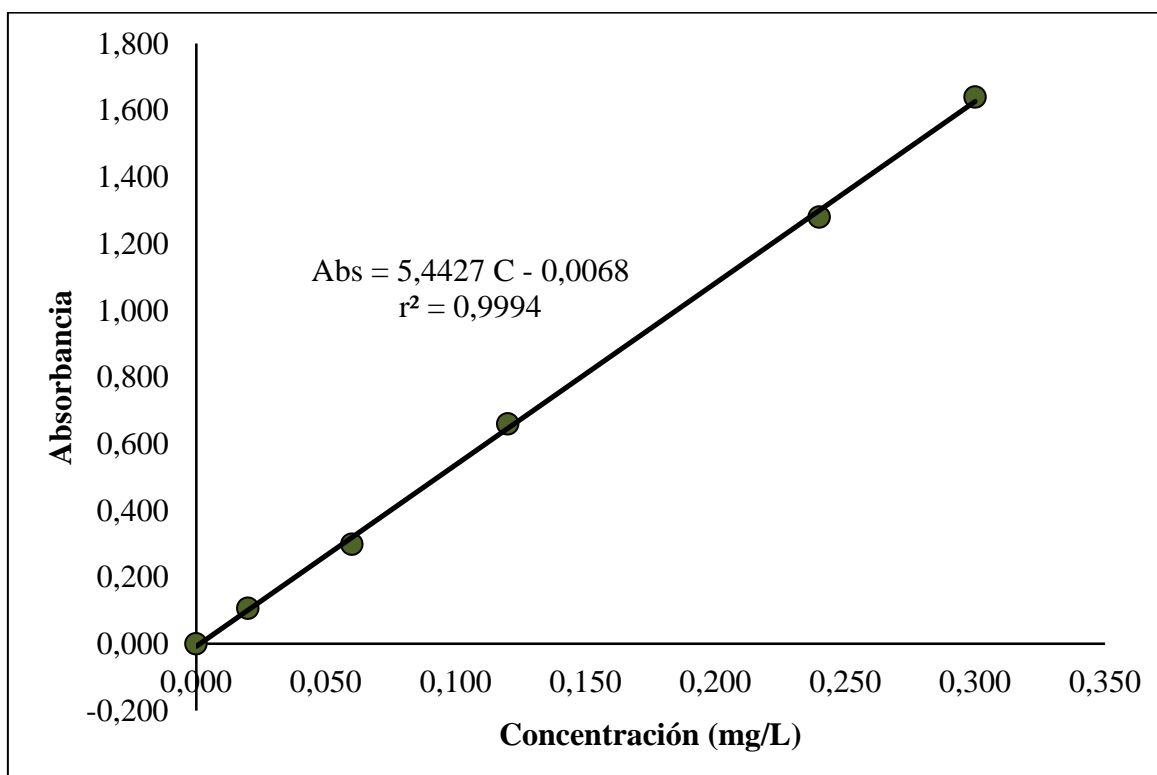
#### 4.1.3.2 Linealidad para la determinación de nitritos.

**Tabla 4-37.** Determinación de absorbancias de nitritos en diferentes días

Nº Lecturas	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> mg/L	Abs Día 1	Abs Día 2	Abs Día 3	Abs Día 4	Abs Día 5
1	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
2	0,020	0,107	0,112	0,113	0,101	0,104
3	0,060	0,299	0,319	0,321	0,336	0,360
4	0,120	0,660	0,662	0,599	0,611	0,662
5	0,240	1,280	1,322	1,295	1,322	1,295
6	0,300	1,640	1,295	1,645	1,481	1,510

**Nota:** Absorbancias obtenidas a cada nivel de concentración, preparadas a partir de una solución madre de nitritos, los mismos que se utilizaron para realizar los gráficos de las curvas de calibración individual para nitritos.

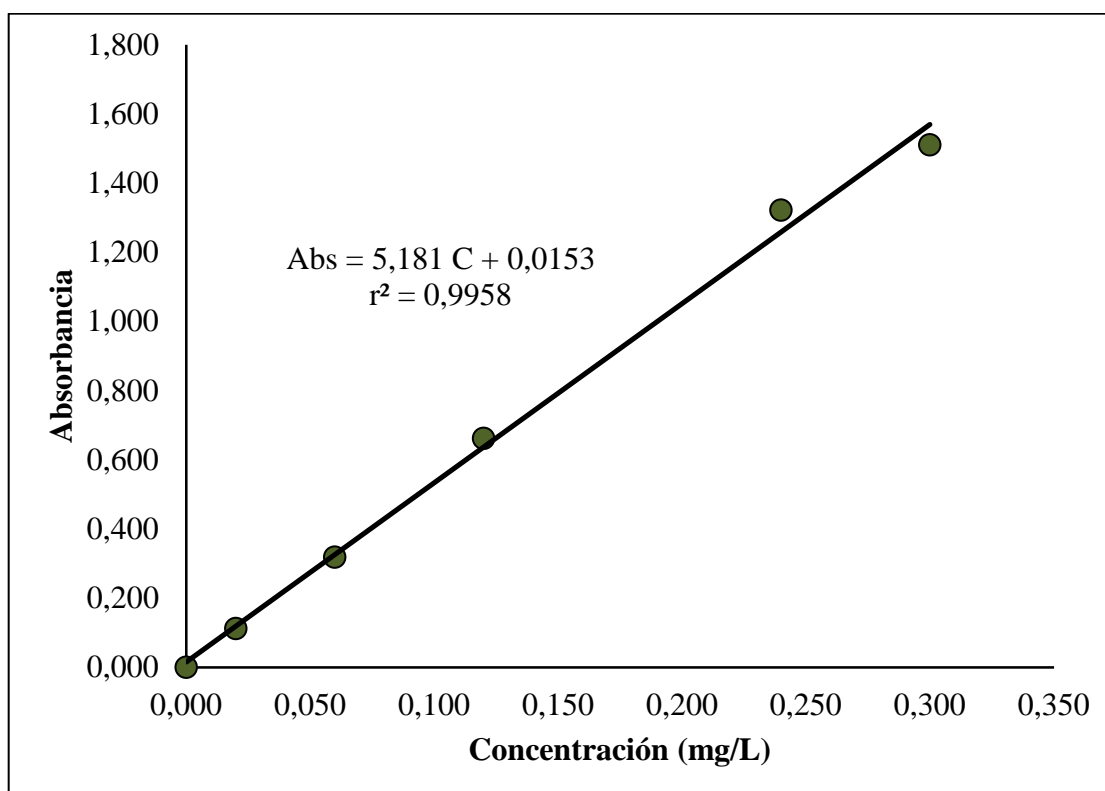
**Gráfica 4-6.** Curva de calibración de nitritos día 1



**Tabla 4-38.** Análisis de la curva de calibración  
de nitritos día 1

<b>m (L/mg)</b>	5,4427	<b>Lo</b>	-0,0068
<b>Sm</b>	0,01459	<b>S Lo</b>	0,00769
<b>S y,x</b>	0,01459		
<b>r</b>	<b>0,9997</b>		
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9994		

**Gráfica 4-7.** Curva de calibración de nitritos día 2

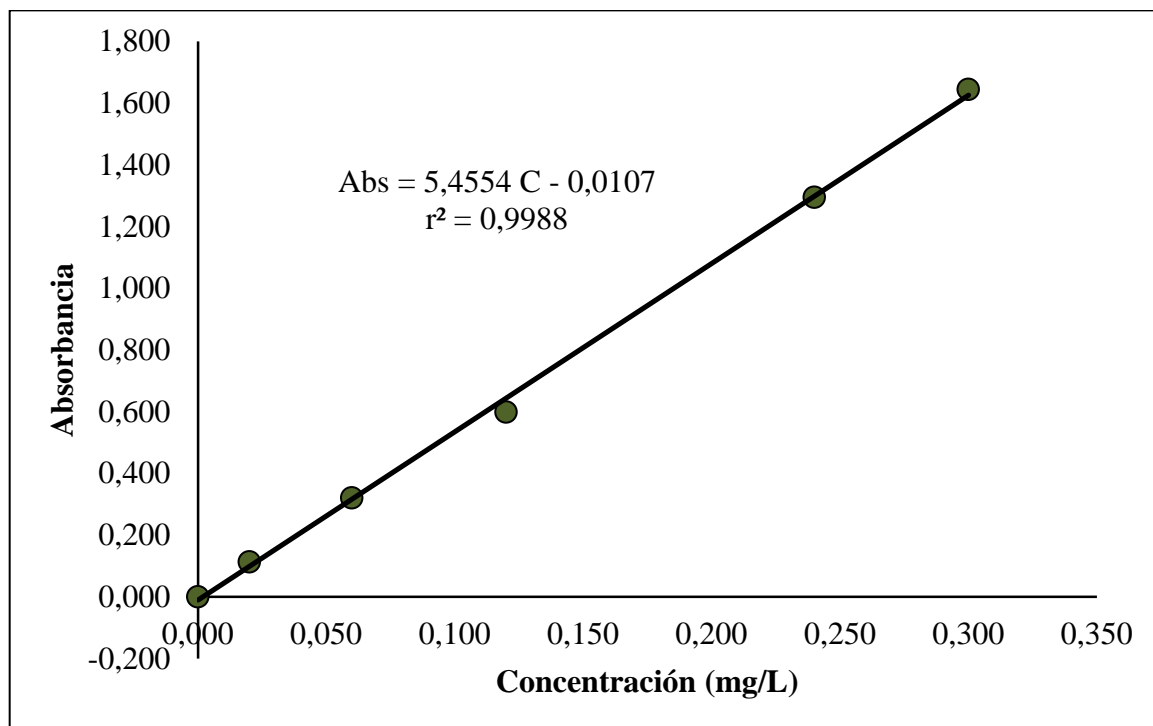


**Tabla 4-39.** Análisis de la curva de calibración  
de nitritos día 2

<b>m (L/mg)</b>	5,1810	<b>Lo</b>	0,0153
<b>Sm</b>	0,17752	<b>S Lo</b>	0,02557
<b>S y,x</b>	0,04853		
<b>r</b>	<b>0,9979</b>		
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9958		



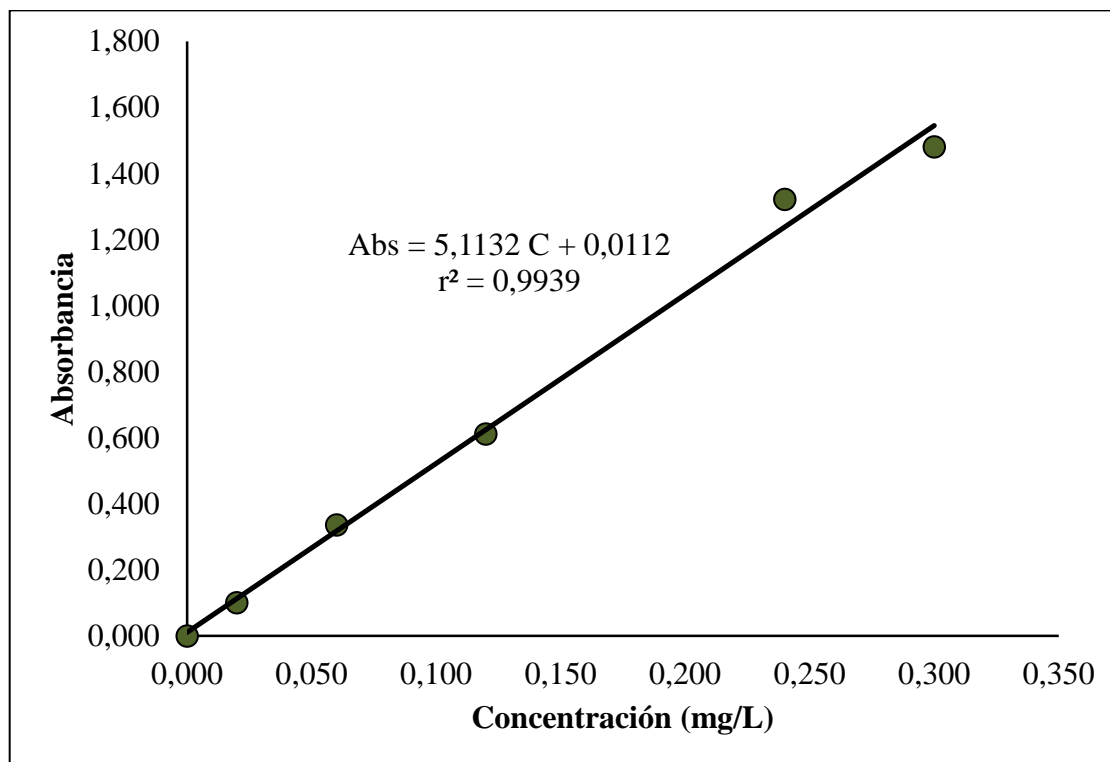
**Gráfica 4-8.** Curva de calibración de nitritos día 3



**Tabla 4-40.** Análisis de la curva de calibración de nitritos día 3

<b>m (L/mg)</b>	5,4554	<b>Lo</b>	-0,0107
<b>Sm</b>	0,07886	<b>S Lo</b>	0,01136
<b>S y,x</b>	0,02156		
<b>r</b>	<b>0,9994</b>		
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9988		

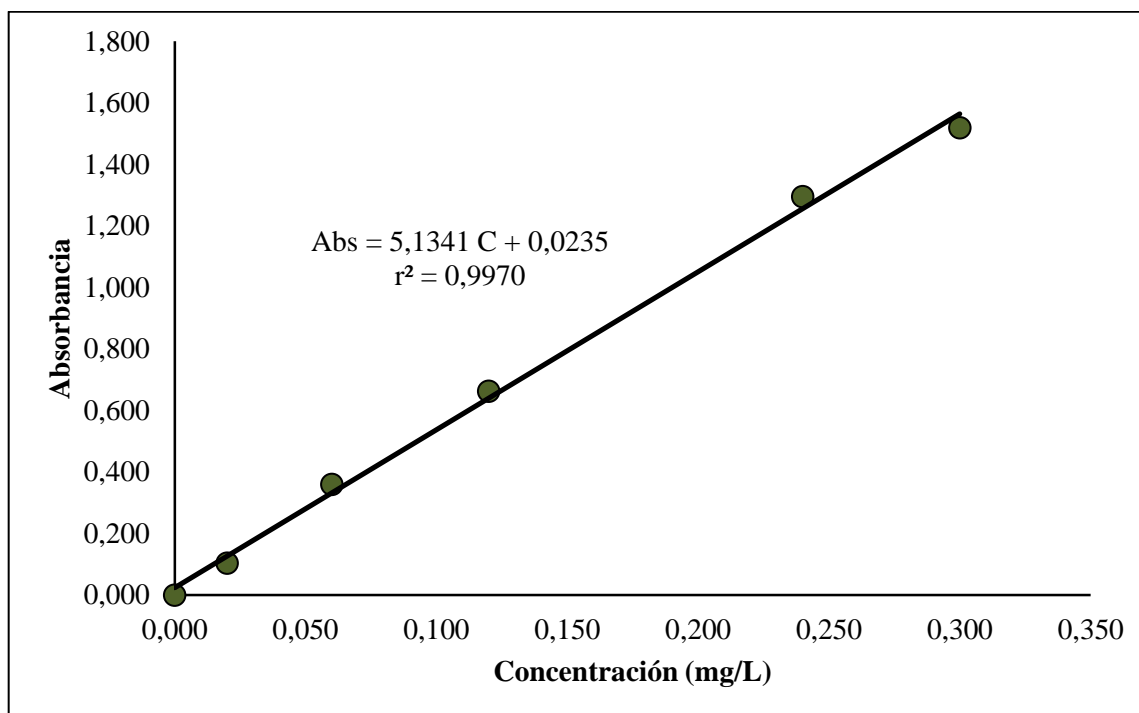
**Gráfica 4-9.** Curva de calibración de nitritos día 4



**Tabla 4-41.** Análisis de la curva de calibración de nitritos día 4

<b>m (L/mg)</b>	5,1132	<b>Lo</b>	0,0112
<b>Sm</b>	0,22699	<b>S Lo</b>	0,03270
<b>S y,x</b>	0,06205		
<b>r</b>	<b>0,9970</b>		
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9939		

**Gráfica 4-10.** Curva de calibración de nitritos día 5



**Tabla 4-42.** Análisis de la curva de calibración de nitritos día 5

<b>m (l/mg)</b>	5,1341	<b>Lo</b>	0,0235
<b>Sm (l/mg)</b>	0,17279	<b>S Lo</b>	0,02489
<b>S y,x</b>	0,04724		
<b>r</b>	<b>0,9985</b>		
<b>r²</b>	0,9970		

- En los gráficos 6,7,8,9,10 se muestra las curvas de calibración individuales de nitritos, con las respectivas ecuaciones lineales (ec. 4 , pág.12) y el coeficiente de determinación  $r^2$  que en cada curva  $r^2 > 0,99$  (ec. 5, pág.13), este valor demuestra la linealidad del método y la correlación entre concentración y absorbancia.
- En las tablas 38,39,40,41,42 se observa los cálculos para cada curva de calibración en 5 días diferentes, en donde nos muestra las pendientes (m), la ordenada al origen (lo) con sus respectivas desviaciones estándares (S) de acuerdo a las ecuaciones 7,8 de la pág.13. Además se encuentra el error típico Sxy (ec.6, pág. 13) de las curvas de calibración individuales que representa la incertidumbre por curva de calibración, es decir el grado de dispersión de los datos respecto al valor esperado.

**Tabla 4-43.** Análisis global de las curvas de calibración de nitritos

N° Días	Pendiente (a=m)	Intercepto (Lo)	Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )
1	5,4427	-0,0068	0,9994
2	5,1810	0,0153	0,9958
3	5,4554	-0,0107	0,9988
4	5,1132	0,0112	0,9939
5	5,1341	0,0235	0,9970
$\bar{X}$	5,298	0,002	0,9970
S	0,170	0,015	0,0022
		t calculado	36,4600
		t tablas	2,776

**Nota:** Se muestra los valores del coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>), la pendiente (m), que representa la sensibilidad del método, mayor pendiente mayor sensibilidad, útil a la hora de efectuar futuras calibraciones, por otro lado el término independiente o intersección con el eje y (Lo) está relacionado con el error sistemático del método.

- Con la ec. 9 de la pág. 14 se calculó el t-student dos colas en donde t calculado > t tablas, por lo que se rechaza la hipótesis nula Ho, siendo la correlación significativa con la probabilidad calculada.

#### 4.1.3.3 *Exactitud para la determinación de nitritos.*

La exactitud se determinó a través de la veracidad y precisión:

**Precisión.**

- *Repetibilidad*

**Tabla 4-44.** Análisis de repetibilidad de nitritos

<b>Tiempo</b>	<b>Día 1</b>		
<b>Analito</b>	<b>NITRITOS</b>		
<b>Nº de Lecturas</b>	0,020 mg/L	0,120 mg/L	0,300 mg/L
1	0,020	0,124	0,280
2	0,020	0,124	0,271
3	0,020	0,118	0,278
4	0,020	0,118	0,306
5	0,019	0,123	0,296
6	0,021	0,124	0,306
7	0,021	0,123	0,284
8	0,021	0,115	0,297
9	0,021	0,119	0,289
10	0,021	0,123	0,278
$\bar{X}$	0,020	0,121	0,289
S	0,0007	0,003	0,012
S <sup>2</sup>	4,8889E-07	1,0767E-05	0,00015117
%CV	3,4275	2,7095	4,2617

**Tabla 4-45.** Análisis de varianza de nitritos para repetibilidad

<b>Cmg/L</b>	$\bar{X}$	<b>S</b>	<b>S<sup>2</sup></b>	<b>F<sub>CALCULADA</sub></b>	<b>F<sub>TABULADA</sub></b>
0,020	0,020	0,0007	4,8889E-07	22,02	3,18
0,120	0,121	0,003	1,0767E-05	14,04	3,18
0,300	0,289	0,012	0,00015117	309,21	3,18
<b>Lr</b>	0,002				
<b>Lr</b>	0,034				

**Nota:** Se muestra los valores obtenidos de repetibilidad junto con las desviaciones estándares (S) y las varianzas ( $S^2$ ), por el método de mínimos cuadrados, en cada concentración

Se obtuvo:

- ✓ El estadístico F utilizando la ec. 17 de la pág. 18, se puede observar que para cada nivel de concentración  $F_{calc}$  es mayor a  $F_{tab}$ , existe diferencia significativa, existe repetibilidad en cada caso y con ello precisión y exactitud.
- ✓ Además de un rango de repetibilidad como criterio de aceptación.

- *Reproducibilidad*

**Tabla 4-46.** Análisis de reproducibilidad de nitritos

Día	Analito	NITRITOS		
	Nº de Lecturas	0,020 mg/L	0,120 mg/L	0,300 mg/L
1	1	0,020	0,124	0,262
	2	0,020	0,125	0,261
2	3	0,020	0,124	0,265
	4	0,020	0,118	0,306
3	5	0,020	0,113	0,296
	6	0,021	0,121	0,277
4	7	0,018	0,114	0,258
	8	0,018	0,120	0,277
5	9	0,019	0,116	0,284
	10	0,019	0,118	0,271
$\bar{X}$		0,020	0,119	0,276
S		0,001	0,004	0,016
Varianza		9,44444E-07	1,80111E-05	0,000251

**Tabla 4-47.** Análisis de varianza de nitritos para reproducibilidad

Cmg/L	$\bar{X}$	S	Varianza	F <sub>CALCULADA</sub>	F <sub>TABULADA</sub>
0,020	0,020	0,001	9,44444E-07	19,07	3,18
0,120	0,119	0,004	1,80111E-05	13,92	3,18
0,300	0,276	0,016	0,000250678	265,42	3,18
LR	0,003				
LR	0,044				

**Nota:** Se muestra los valores obtenidos de reproducibilidad junto con las desviaciones estándares (S) y las varianzas ( $S^2$ ), por el método de mínimos cuadrados, en cada concentración.

- Se obtuvo:
  - ✓ El estadístico F utilizando la ec. 17 de la pág. 18, se puede observar que para cada rango de concentración  $F_{calc}$  es mayor a  $F_{tab}$ , existe diferencia significativa y con ello reproducibilidad, precisión y exactitud.
  - ✓ Las desviaciones estándares de cada concentración son utilizados para el cálculo de incertidumbre combinada.
  - ✓ Además del rango de reproducibilidad como criterio de aceptación.

#### **Veracidad.**

- *Recuperación:* La exactitud se determinó con el porcentaje de recuperación evaluando el Material de Referencia Certificado MRC para nitritos y comparando con su certificado de calidad o utilizando las ecuaciones 13 y 14 de las páginas 15 y 16 respectivamente para obtener significancia estadística.

- *Aptitud del laboratorio:*

**Tabla 4-48.** Análisis de desviación del laboratorio en la determinación de nitritos

Puntos	1	2	3
MRC	MDL-010	QCI-0283	WP08-1-37
X declarado C (mg/L)	0,201	0,981	1,13
Sp	0,134	0,054	0,0376
Nº Lecturas	C (mg/L)		
1	0,190	0,965	1,144
2	0,192	0,972	1,135
3	0,195	0,968	1,146
$\bar{X}$	0,192	0,969	1,142
S	0,00252	0,00495	0,00586
Z-score	-0,06	-0,23	0,31
% Recuperabilidad	96	99	101

**Nota:** Se muestra la aptitud del laboratorio mediante la prueba Z-score establecida en la ec.18 de la pág.20 y utilizando los respectivos MRC, También se establece el % de recuperabilidad para cada rango.

#### 4.1.3.4 Incertidumbre del método para la determinación de nitritos.

**Función respuesta.**

**Tabla 4-49.** Resolución del espectrofotómetro HACH DR 2800

	ABSORBANCIA	%	%
RESOLUCION ESPECTROFOTÓMETRO	0,001	0,323	0,186

**Nota:** Resolución en absorbancia del espectrofotómetro HACH DR 2800 de acuerdo a la calibración del equipo, expresado en porcentaje y utilizando la ec. 19 de la pág. 21.

- Indica la incertidumbre que tendrá cada medición para el cálculo de la incertidumbre combinada de los estándares de nitritos (%μ nivel).



**Tabla 4-50.** Lectura de absorbancias para cada concentración de nitritos

Nº	VALOR NOMINAL C (mg/L)	LECTURA ABS.	C mg/L	RESIDUAL	FALTA DE AJUSTE FA	% FA	S de C	µA mg/L	µA %
1	0,020	0,107	0,020	0,000	0,001	5,00	0,00058	0,0003	1,667
2		0,112	0,021	0,001					
3		0,113	0,021	0,001					
4	0,060	0,299	0,056	0,004	0,004	6,67	0,00231	0,0013	2,222
5		0,319	0,060	0,000					
6		0,321	0,060	0,000					
7	0,120	0,660	0,123	0,003	0,005	4,17	0,00493	0,0028	2,373
8		0,662	0,124	0,004					
9		0,599	0,115	0,005					
10	0,240	1,280	0,239	0,001	0,002	0,83	0,00153	0,0009	0,367
11		1,332	0,241	0,001					
12		1,295	0,242	0,002					
13	0,300	1,640	0,306	0,006	0,006	2,00	0,00577	0,0033	1,111
14		1,511	0,296	0,004					
15		1,645	0,306	0,006					
					%FA (máx):	6,67			

**Nota:** En la tabla 59 se muestra las lecturas de absorbancias y concentración de los estándares preparados.

- Se aprecia las desviaciones estándares (S) para cada concentración las misma que junto a la aplicación de la ec. 19 de la pág 21 se calculó las incertidumbres de los estándares  $\mu A$ , expresada en mg/L y en porcentaje y estas serán utilizadas para el cálculo de la incertidumbre combinada de cada nivel de concentración (% $\mu$  nivel).
- También se observa el porcentaje residual más elevado que se obtiene de la resta del valor nominal con el valor experimental, de los cuales se toma el máximo valor del residual para cada concentración obteniendo falta de ajuste expresándolo en porcentaje y con ello el % máximo de falta de ajuste (%FA máx) que nos sirve para calcular la incertidumbre expandida de cada estándar.

**Tabla 4-51.** Incertidumbre de la solución madre de nitritos ( $\mu$ solución madre)

U Solución madre de nitritos:  $\sqrt{(\mu_{\text{balanza}})^2 + (\mu_{\text{resolución}})^2 + (\mu_a)/(va)^2}$

		%
$\mu$ balón (1000ml)	0,4	0,0400
$\mu$ balanza	0,0001	0,00005
$\mu$ resolución	0,0001	0,00003
$\mu$ balón/2		0,0200
$\mu$ solución madre		0,02

**Nota:** Cálculo de la incertidumbre combinada que existe en la preparación de la solución madre de nitritos ( $\mu$ solución madre), calculada con las ecuaciones 20-21 de la página 22.

- Se utilizó las siguientes incertidumbres:
  - ✓ balanza ( $\mu_{\text{balanza}}$ ), obtenida de la resolución de la misma expresada en porcentaje.
  - ✓ incertidumbre estándar de la resolución ( $\mu_{\text{resolución}}$ ), utilizando la ec. 19 y expresado en porcentaje,
  - ✓ balón de 1000ml ( $\mu_{\text{balón}}$ ), obtenida de la resolución del balón dividiéndola para 2.
- La  $\mu$ solución madre sirve para calcular la incertidumbre combinada de la preparación de estándares a cada nivel de concentración ( $\mu_{\text{patrón}}$ ).

**Tabla 4-52.** Cálculo de la incertidumbre en la preparación de estándares para cada nivel de concentración de nitritos ( $\mu$ patrón)

C (ppm)	0,020	0,060	0,120	0,240	0,300
$\mu FD = FD * \sqrt{(\mu vt)/(vt)^2 + (\mu a)/(va)^2}$					
FD	125	42	21	10	8
$\mu$ balón (100ml)	0,1				
	%				
$\mu vt = \mu \text{balon}(100\text{ml})/100$	0,001				
$\mu a = \mu \text{ balón}(100\text{ml})/2$	0,050				
$\mu FD$	6,251	2,080	1,040	0,520	0,415
$\mu$ bureta (25ml)	0,100				
$\mu$ solución madre	0,020				
$\mu$ patrón	6,25	2,08	1,05	0,53	0,43

**Nota:** Cálculo de la incertidumbre combinada que existe en la preparación de los estándares para cada nivel de concentración de nitritos ( $\mu$ patrón), calculada con la ec. 20 de la pág. 22.

- Las incertidumbres utilizadas son:
  - ✓ solución madre ( $\mu$ solución madre), de la tabla 51,
  - ✓ bureta de 25ml ( $\mu$ bureta), obtenida con la resolución de la bureta expresada en unidad y porcentaje,
  - ✓ factor de dilución ( $\mu FD$ ), utilizando la ec.20 de la pág.20 y el FD de cada concentración.
  - ✓ balón de 100ml ( $\mu$ balón), obtenida con la resolución del balón dividiéndola para dos.
- La  $\mu$ patrón sirve para calcular la incertidumbre de los estándares de boro ( $\% \mu$ nivel).

**Tabla 4-53.** Resumen del cálculo de la incertidumbre de los estándares de nitritos ( $\% \mu$ nivel)

C ppm	0,020	0,060	0,120	0,240	0,300
$\mu A$	1,667	2,222	2,373	0,367	1,111
$\mu$ resol	0,186	0,186	0,186	0,186	0,186
$\mu$ patrón	6,252	2,084	1,046	0,532	0,430
$\% \mu$ nivel	6,47	3,05	2,60	0,67	1,21

**Nota:** Incertidumbre combinada de los estándares de nitritos ( $\% \mu$ nivel), utilizando la ec. 20 de la pág.22.

- Se utilizó las siguientes incertidumbres:
  - ✓ incertidumbre de la preparación de los estándares para cada nivel de concentración de nitritos ( $\mu$ patrón), de la tabla 52.
  - ✓ incertidumbre del espectrofotómetro ( $\mu$ resol.), de la tabla 49
  - ✓ incertidumbre de cada concentración ( $\mu$ A) de la tabla 50
- Utilizada para el cálculo de la incertidumbre expandida.

**Tabla 4-54. Incertidumbre**  
Expandida para nitritos (%UFR)

VALOR NOMINAL (C mg/l)	%U
0,020	19,61
0,060	12,77
0,120	11,87
0,240	8,01
0,300	9,08
%UFR(k:2)	19,61

**Nota:** Incertidumbre expandida de la función respuesta (%UFR) proporcionado a un alto nivel de confianza (95%) en la que utilizando la ec.23 de la pág. 22  $k=2$ .

- La incertidumbre expandida está dada por el valor máximo de %U de cada valor nominal, los mismos que se calculan utilizando %F<sub>Amáx</sub> (tabla 50) + % $\mu$ nivel (tabla 53).
- El valor de %UFR (k:2) es la incertidumbre de la función respuesta dada por la calibración de los equipos y materiales utilizados en la medición.

### Evaluación de la Incertidumbre según el rango.

**Tabla 4-55.** Incertidumbre de los equipos utilizados en la medición de nitritos

EQUIPO		$\mu$	unidades
U FR(calibración)		19,613	%
Pipeta (25ml)	0,1000	0,400	%
Resolución Espectrofotómetro (abs.)	0,0010	0,067	%

**Nota:** Incertidumbre ( $\mu$ ) existente en los equipos utilizados en la determinación de nitritos.

- Entre los que se encuentra:
  - ✓ la incertidumbre de la función respuesta de la preparación de estándares de la tabla 54,
  - ✓ la incertidumbre de la pipeta de 25 ml que se obtuvo de la resolución de la pipeta expresada en unidad.
  - ✓ y la incertidumbre de la resolución del espectrofotómetro HACH DR2800, de la tabla 49.
- Tomando como base la calibración de los mismos y expresados en porcentaje.
- Rango bajo**

**Tabla 4-56.** Incertidumbre de reproducibilidad y exactitud del rango bajo de nitritos

	mg/L	Valor Nominal	%
S reproducibilidad	0,001	0,020	4,86
S exactitud	0,003	0,201	1,25

**Tabla 4-57.** Incertidumbre ( $\mu$ ) de rango bajo de nitritos

INCERTIDUMBRE ACUMULADA		11,02
INCERTIDUMBRE EXPANDIDA		22,04
	mg/L	U%
RANGO	0,010 - 0,020	22

- En la tabla 56 se indica la incertidumbre de la reproducibilidad y exactitud dada por las desviaciones estándares (S) de la tabla 46 y 48 (aptitud del laboratorio) respectivamente, a las

que se divide para el valor nominal declarado o MRC y se las expresa en porcentaje para el rango bajo en la determinación de nitritos.

- En la tabla 57 se muestra la incertidumbre ( $\mu$ ) acumulada dentro de la cual se tomó en cuenta las incertidumbres:

- ✓ de los equipos (tabla 55),
- ✓ de la reproducibilidad y exactitud (tabla 56)

Calculado con la ec. 20 y 21 de la pág. 22 y expresadas en porcentaje

Se obtiene la incertidumbre expandida utilizando la ec.23 de la pág. 22 junto con la incertidumbre acumulada dentro del rango bajo en la determinación de nitritos.

- **Rango medio**

**Tabla 4-58.** Incertidumbre de reproducibilidad y exactitud del rango medio de nitritos

	mg/L	Valor Nominal	%
<b>S reproducibilidad</b>	0,004	0,120	3,54
<b>S exactitud</b>	0,005	0,981	0,50

**Tabla 4-59.** Incertidumbre ( $\mu$ ) de rango medio de nitritos

<b>INCERTIDUMBRE ACUMULADA</b>		10,44
<b>INCERTIDUMBRE EXPANDIDA</b>		20,88
	<b>mg/l</b>	<b>U%</b>
<b>RANGO</b>	0,020---0,120	21

- En la tabla 58 se indica la incertidumbre de la reproducibilidad y exactitud dada por las desviaciones estándares (S) de la tabla 46 y 48 (aptitud del laboratorio) respectivamente, a las que se divide para el valor nominal declarado o MRC y se las expresa en porcentaje para el rango medio en la determinación de nitritos.
- En la tabla 68 se muestra la incertidumbre ( $\mu$ ) acumulada dentro de la cual se tomó en cuenta las incertidumbres:
  - ✓ de los equipos (tabla 55),
  - ✓ de la reproducibilidad y exactitud (tabla 58)

Calculado con la ec. 20 y 21 de la pág. 22 y expresadas en porcentaje

Se obtiene la incertidumbre expandida utilizando la ec.23 de la pág. 22 junto con la incertidumbre acumulada dentro del rango medio en la determinación de nitritos.

- **Rango alto**

**Tabla 4-60.** Incertidumbre de reproducibilidad y exactitud del rango alto de nitritos

	mg/L	Valor Nominal	%
<b>S reproducibilidad</b>	0,016	0,300	5,28
<b>S exactitud</b>	0,006	1,13	0,52

**Tabla 4-61.** Incertidumbre ( $\mu$ ) de rango alto de nitritos

<b>INCERTIDUMBRE ACUMULADA</b>		11,15
<b>INCERTIDUMBRE EXPANDIDA</b>		22,30
	<b>mg/L</b>	<b>U%</b>
<b>RANGO</b>	0,120--0,300	22

- En la tabla 60 se indica la incertidumbre de la reproducibilidad y exactitud dada por las desviaciones estándares (S) de la tabla 46 y 48 (aptitud del laboratorio) respectivamente, a las que se divide para el valor nominal declarado o MRC y se las expresa en porcentaje para el rango alto en la determinación de nitritos.
- En la tabla 61 se muestra la incertidumbre ( $\mu$ ) acumulada dentro de la cual se tomó en cuenta las incertidumbres:
  - ✓ de los equipos (tabla 55),
  - ✓ de la reproducibilidad y exactitud (tabla 60)

Calculado con la ec. 20 y 21 de la pág. 22 y expresadas en porcentaje

Se obtiene la incertidumbre expandida utilizando la ec.23 de la pág. 22 junto con la incertidumbre acumulada dentro del rango alto en la determinación de nitritos.

**Tabla 4-62.** Resumen de resultados de nitritos y criterios de aceptación

FRECUENCIA	PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN	VALOR OBTENIDO
1 vez cada 5 muestras	DUPLICADO Repetibilidad Reproducibilidad	Lr LR	$\leq 0.002$ BAJO $\leq 0.009$ MEDIO $\leq 0.034$ ALTO
1 vez al Año	Intercomparación	Z-score	$\leq 2$
1 vez al Mes	QC/Material de Referencia	% Recuperabilidad	80-120%
1 vez al año	Curvas de calibración	$r^2$	$> 0.99$
		Pendiente (m)	Entre (4.689-5.651)
		(b)	Entre (-0.024-0.042)

Incertidumbre del método	
RANGO	U % (factor K=2)
RANGO BAJO	22
RANGO MEDIO	21
RANGO ALTO	22

**Nota:** En la tabla 71 se muestra el resumen de los parámetros con los respectivos criterios de aceptación.

- Se estableció el rango de incertidumbre ( $\mu$ ) del método.



## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

##### 5.1.1 Conclusiones de la determinación de Boro

- A través del desarrollo de los parámetros de validación establecidos, y con el cumplimiento de los mismos de acuerdo a las normas (ver anexo B), se establece que el método para la determinación de boro en agua mediante espectrofotometría de luz visible está validado.
- Se determinó boro por espectrofotometría de luz visible utilizando el método estándar del APHA, Método 4500-B C. Carmínico, y la técnica del manual Handbook HACH DR 2800, Método 8015 Carmine Method Powder Pillows.
- Los parámetros establecidos para la determinación de boro fueron: Límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), linealidad y exactitud, establecida por repetibilidad (r), reproducibilidad (R), recuperabilidad y aptitud del laboratorio.
- A partir del análisis cualitativo se determinó el límite de detección (LD) de boro 0,1 mg/l. el método es capaz de detectar cantidades mínimas de boro en una muestra, siempre que estén por encima de la concentración de 0,1mg/L.
- La concentración mínima de boro que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud aceptables en condiciones experimentales indicadas es de 0,5 mg/L.  
A partir del análisis cuantitativo se determinó el límite de cuantificación (LC) 0,5 mg/L, de esta forma se estableció que el método es capaz de cuantificar en forma confiable cantidades mínimas de boro en una muestra, siempre que tengan una concentración igual o mayor 0,5mg/L.  
Con el límite de Cuantificación se establece el rango de trabajo, bajo: 0,5-1,0 (mg/L) y alto: 1,0-10,0 (mg/L).
- Se comprobó el cumplimiento de la linealidad del método por su elevado valor del coeficiente de determinación  $r^2 > 0,99$  en una recta del tipo  $y = m x + b$ ; y por obtener un  $t_{calc.} > t_{tab.}$
- Existe repetibilidad y reproducibilidad en el método de determinación de boro para los rangos altos y bajos, por tener una  $f_{calc.} > f_{tabla}$  no se puede guardar la curva de calibración en el software y se requiere realizar una previamente a la lectura de las muestras.
- La precisión obtenida tiene un Lr y LR de 0,2-0,9 en todo el rango.
- La exactitud del método analítico cumple con los parámetros y/o criterios de aceptación teniendo un rango de recuperación del 80-120%, indicado por el MRC utilizado.

- La incertidumbre del método de determinación de boro para concentraciones del rango bajo que van de 0,5 a 1,0 mg/L es de  $\% \mu = 26,4\%$  y para concentraciones del rango alto que van de 1,0- 10,0 mg/L es de  $\% \mu = 26,6\%$ .
- Se demostró que el método para determinar boro es apto para la utilización del mismo en el análisis de muestras de agua mediante la ampliación de la acreditación del laboratorio.

### 5.1.2 Conclusiones de la determinación de Fluoruros

- A través del desarrollo de los parámetros de validación establecidos, y con el cumplimiento de los mismos de acuerdo a las normas (ver anexo B), se establece que el método para la determinación de fluoruros en agua mediante espectrofotometría de luz visible está validado.
- Se determinó fluoruros por espectrofotometría de luz visible utilizando el método 4500-F<sup>-</sup> E Complexona del Standard Methods APHA, método 340.3 del EPA y la técnica 1.14557.000. Test en cubetas Fluoruros F<sup>-</sup> del manual Spectroquant; procedimientos Merck.
- Los parámetros establecidos para la determinación de fluoruros fueron: Límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), exactitud, establecida por repetibilidad (r), reproducibilidad (R), recuperabilidad y aptitud del laboratorio.
- A partir del análisis cualitativo se determinó el límite de detección (LD) de fluoruros 0,07 mg/L el método es capaz de detectar cantidades mínimas de fluoruros en una muestra, siempre que estén por encima de la concentración de 0,07mg/L.
- La concentración mínima de fluoruros que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud aceptables en condiciones experimentales indicadas es de 0,23 mg/L. A partir del análisis cuantitativo se determinó el límite de cuantificación (LC) 0,23 mg/L, de esta forma se estableció que el método es capaz de cuantificar en forma confiable cantidades mínimas de fluoruros en una muestra, siempre que tengan una concentración igual o mayor 0,23mg/L.
- Con el límite de Cuantificación se establece el rango de trabajo, 0,23-2,00mg/L.
- Existe repetibilidad y reproducibilidad en el método de determinación de fluoruros, por tener una  $f_{calc.} > f_{tabla}$  no se puede guardar los datos en el software y se requiere realizar estándares previamente a la lectura de las muestras.
- La precisión obtenida tiene un Lr de 0,09-0,16 y LR de 0,09-0,19 en todo el rango de trabajo.
- La exactitud del método analítico cumple con los parámetros y/o criterios de aceptación teniendo un rango de recuperación del 97-107%, entra en el rango indicado por el MRC que va de 80-120%, y obteniendo  $t_{calculada} < t_{tablas}$  no es necesario corrección de los datos.
- La incertidumbre del método de determinación de fluoruros para concentraciones que van de 0,23 a 2,00 mg/L de fluoruros es  $\% \mu = 11,07\%$ .

- Se demostró que el método para determinar fluoruros es apto para la utilización del mismo en el análisis de muestras de agua mediante la ampliación de la acreditación del laboratorio.

### 5.1.3 Conclusiones de la determinación de Nitritos

- A través del desarrollo de los parámetros de validación establecidos, y con el cumplimiento de los mismos de acuerdo a las normas (ver anexo B), se establece que el método para la determinación de nitritos en agua mediante espectrofotometría de luz visible está validado.
- Se determinó nitritos por espectrofotometría de luz visible utilizando el método colorimétrico 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> B del Standard Methods APHA, y la técnica 8507 Diazotization Method Powder Pillows or AccuVac® Ampuls del manual Handbook HACH DR 2800.
- Los parámetros establecidos para la determinación de nitritos fueron: Límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), linealidad y exactitud, establecida por repetibilidad (r), reproducibilidad (R), recuperabilidad y aptitud del laboratorio.
- A partir del análisis cualitativo se determinó el límite de detección (LD) de nitritos 0,003 mg/L el método es capaz de detectar cantidades mínimas de nitritos en una muestra, siempre que estén por encima de la concentración de 0,003mg/L.
- La concentración mínima de nitritos que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud aceptables en condiciones experimentales indicadas es de 0,010 mg/L. A partir del análisis cuantitativo se determinó el límite de cuantificación (LC) 0,010 mg/L, de esta forma se estableció que el método es capaz de cuantificar en forma confiable cantidades mínimas de nitritos en una muestra, siempre que tengan una concentración igual o mayor 0,010 mg/L.  
Con el límite de Cuantificación se establece el rango de trabajo, bajo: 0,010-0,020 mg/L; medio: 0,020-0,120 mg/L y alto: 0,120-0,300 mg/L.
- Se comprobó el cumplimiento de la linealidad del método por su elevado valor del coeficiente de determinación  $r^2 > 0,99$  en una recta del tipo  $y = m x + b$ ; y por obtener un  $t_{calc.} > t_{tab.}$
- Existe repetibilidad y reproducibilidad en el método de determinación de nitritos para los rangos alto, medio y bajo, por tener una  $f_{calc.} > f_{tabla}$  no se puede guardar la curva de calibración en el software y se requiere realizar una previamente a la lectura de las muestras.
- La precisión obtenida tiene un Lr de 0,002-0,034 y LR de 0,003-0,044 en todo el rango.
- La exactitud del método analítico cumple con los parámetros y/o criterios de aceptación teniendo un rango de recuperación del 96-101%, entra en el rango indicado por el MRC que va de 80-120%.
- La incertidumbre del método para la determinación de nitritos para concentraciones del rango bajo que van de 0,010 a 0,020 mg/L es  $\% \mu = 22\%$ , para concentraciones del rango medio que

van de 0,020 a 0,120 mg/L es  $\% \mu = 21\%$  y para concentraciones del rango alto que van de 0,120 a 0,300 mg/L  $\% \mu = 22\%$ .

- Se demostró que el método para determinar nitritos es apto para la utilización del mismo en el análisis de muestras de agua mediante la ampliación de la acreditación del laboratorio.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- En la validación para la determinación de boro, en la preparación de la solución madre es recomendable utilizar ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) anhidro pero dado que el ácido pierde peso al secarlo a  $105^\circ\text{C}$  utilícese reactivo que cumpla las especificaciones ACS o reactivo que se encuentre en un frasco bien cerrado para evitar que penetre la humedad atmosférica.
- Todos los reactivos utilizados para la determinación de boro deben encontrarse en envases de polietileno o exentos de boro no en vidrio de borosilicato por más de una hora ya que la solución de boro puede lixiviar de estos contenedores.
- En la validación para la determinación de fluoruros, en la preparación de la solución madre es recomendable utilizar fluoruro de potasio (KF) anhidro.
- En la validación para la determinación de nitritos, en la preparación de la solución madre es recomendable utilizar nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) nuevo o en frasco recién abierto que este bien cerrado para evitar la entrada de aire puesto que los nitritos oxidan fácilmente en presencia de humedad.
- Se aconseja utilizar en la preparación de todas las soluciones agua exenta de nitritos de máxima pureza.
- Si se desea conservar la solución madre de nitritos es recomendable colocar 1 ml de cloroformo  $\text{CHCl}_3/\text{L}$  pero tomando en cuenta que las soluciones de nitritos no son estables es mejor si se prepara a diario.
- Se recomienda que el laboratorio OSP de Ofertas de Servicios y Productos coloque contraseñas en los registros de los resultados de las validaciones de determinación de boro, fluoruros y nitritos, como procedimiento para salvaguardar los cálculos y que no sean modificados por equivocación.
- En el caso de que un nuevo analista utilice estos métodos, se aconseja que se familiarice con los mismos y no es necesaria una nueva validación, solo se deberá medir su precisión.

- Realizar otras validaciones para incrementar el alcance de acreditación del laboratorio ambiental de Oferta de Servicios y Productos (OSP) otorgado por el OAE.

## BIBLIOGRAFÍA

- (EURACHEM) a Focus for Analytical Chemistry in Europe. (2005, noviembre). *Centro Nacional de Metrología (CENAM)*. Retrieved marzo 2012, from <http://www.metroquimica.com.ar/descargas/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf>
- (UNDOC) Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. (2010). *Naciones Unidas*. Retrieved abril 2012, from [http://www.unodc.org/documents/scientific/Validation\\_Manual\\_STNAR41\\_Ebook\\_S.pdf](http://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf)
- Almazora, I. A. (2003). *iesaltoalmanzora.es*. Retrieved from [http://www.iesaltoalmanzora.es/centro/departamentos/biologia/2bto\\_bio/2\\_bio\\_uni1.htm](http://www.iesaltoalmanzora.es/centro/departamentos/biologia/2bto_bio/2_bio_uni1.htm)
- Andrew D. Eaton, M. A. (2005). (APHA) *Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater* (21a ed.). (2. Amer Public Health Assn, Ed.) Washinton.
- Cátedra de Química Analítica General. Fac. de Agroindustrias. U.N.N.E. (2000). *Universidad Nacional del Nordeste (U.N.N.E.)*. Retrieved abril 2012, from [http://gef-educacion.ambiente.gov.ar/archivos/web/salud\\_ambiente/File/Aguas%20Arsenicales%20y%20con%20Fluor%20en%20Chaco%20Central.pdf](http://gef-educacion.ambiente.gov.ar/archivos/web/salud_ambiente/File/Aguas%20Arsenicales%20y%20con%20Fluor%20en%20Chaco%20Central.pdf)
- Donald Voet, J. G. (2006). Bioquímica: 3ª edición. In J. G. Donald Voet, *Bioquímica: 3ª edición* (D. K. Silvia Rondinone, Trans., pp. 41-43). Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2009). *Codex Alimentarius*. Retrieved marzo 2012, from [www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../cxg\\_072s.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../cxg_072s.pdf)
- HACH Company. (2000). *HACH Manual de Análisis de Agua*. Retrieved diciembre 2011, from HACH Manual de Análisis de Agua: <http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=MANUAL+HACH+2800+ESPAÑOL+AGUAS&source=web&cd=1&ved=0CDIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.hach.com%2Fasset-get.download-en.jsa%3Fid%3D7639984469&ei=bjPmUOuVLoWC9QTpjIG4Ag&usg=AFQjCNFE4gMqNv9rt1txxVITUMyvz5kUA&bvm=bv.1355>
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2010, diciembre). *ISPCH*. Retrieved marzo 2012, from [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento\\_tecnico/2010/12/Guia%20Técnica%201%20validación%20de%20Métodos%20y%20determinación%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medición\\_1.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20Técnica%201%20validación%20de%20Métodos%20y%20determinación%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medición_1.pdf)

- Lora, F. E. (2009, Agosto). *scribd*. Retrieved from <http://es.scribd.com/doc/22048025/Validacion-de-Metodos-Analiticos>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2005). *Fundamentos de Química Analítica*. México: Thomson.
- Soto, M. d. (2000). *UPM Universidad Politécnica de Madrid*. Retrieved abril 2012, from <http://oa.upm.es/155/1/05200006.pdf>
- TULAS Bilioteca Ambiental. (n.d.). *Index of Biblioteca Ambiental DigitalTULAS*. Retrieved from TULAS LIBRO 4, Título 5: [http://www.efficacitas.com/efficacitas\\_es/assets/Desechos%20Peligrosos.pdf](http://www.efficacitas.com/efficacitas_es/assets/Desechos%20Peligrosos.pdf)
- World Health Organization. (2002). (*PAHO*) *Pan American Health Organization*. Retrieved abril 2012, from [http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13\\_Modulo\\_VALIDACIoN\\_de\\_Metodos\\_Fisicoquicos.pdf](http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACIoN_de_Metodos_Fisicoquicos.pdf)

## **ANEXOS**



## **ANEXO A**

Certificado de Acreditación N° OAE LE IC 04-002

Alcance de Acreditación del laboratorio OSP, Oferta de Servicios y Productos

Emitida por el OAE, Organismo de Acreditación Ecuatoriano

## **ANEXO B**

Norma NTE INEN 1108:2011 Requisitos Agua Potable

## **ANEXO C**

Tablas de la distribución t-student

## **ANEXO D**

Tabla de la distribución F-Fisher

## **ANEXO E**

Criterios Generales para acreditación de laboratorios de Ensayo y Calibración

NORMA NTE INEN-ISO/IEC 17025: 2005

OAE CR GA01 R00